

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1963

THÈSE

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Guy WIRIOT

Né le 19 octobre 1929, à Sainte-Adresse (Seine-Maritime)

Présentée et soutenue publiquement le 28 juin 1963

Recherches
sur l'emploi du fractionnement chromatographique
avec gradient de polarité pour l'étude
de l'élimination des 17-céto-stéroïdes urinaires

Président : M. M.F. JAYLE, Professeur

I M P R I M E R I E
R. FOULON & C^{ie}
29, RUE DEPARCIEUX, 29
PARIS — 1963

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

Nom du Candidat : WIRIOT

Prénom : Guy

Date de soutenance : 28 juin 1963

Numéro d'ordre :

(Ces deux mentions seront complétées par le Service de la Bibliothèque)

WIRIOT (Guy). — Recherches sur l'emploi du fractionnement chromatographique avec gradient de polarité pour l'étude de l'élimination des 17-céto-stéroïdes urinaires. — Paris, Imp. R. Foulon et Cie, 1963, in-8°, 95 p., 13 fig.

(Thèse Médec. (Etat), Paris, 1963, N°).

WIRIOT (Guy). — Recherches sur l'emploi du fractionnement chromatographique avec gradient de polarité pour l'étude de l'élimination des 17-céto-stéroïdes urinaires. — Paris, Imp. R. Foulon et Cie, 1963, in-8°, 95 p., 13 fig.

(Thèse Médec. (Etat), Paris, 1963, N°).

WIRIOT (Guy). — Recherches sur l'emploi du fractionnement chromatographique avec gradient de polarité pour l'étude de l'élimination des 17-céto-stéroïdes urinaires. — Paris, Imp. R. Foulon et Cie, 1963, in-8°, 95 p., 13 fig.

(Thèse Médec. (Etat), Paris, 1963, N°).

WIRIOT (Guy). — Recherches sur l'emploi du fractionnement chromatographique avec gradient de polarité pour l'étude de l'élimination des 17-céto-stéroïdes urinaires. — Paris, Imp. R. Foulon et Cie, 1963, in-8°, 95 p., 13 fig.

(Thèse Médec. (Etat), Paris, 1963, N°).



Digitized by the Internet Archive
in 2026

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1963

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Guy WIRIOT

Né le 19 octobre 1929, à Sainte-Adresse (Seine-Maritime)

Présentée et soutenue publiquement le 28 juin 1963

Recherches

**sur l'emploi du fractionnement chromatographique
avec gradient de polarité pour l'étude
de l'élimination des 17-céto-stéroïdes urinaires**

Président : M. M.F. JAYLE, Professeur

IMPRIMERIE
R. FOULON & C^{ie}
29, RUE DEPARCIEUX, 29
PARIS — 1963



PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Alajouanine (T.), Aubin (A.), Bénard (H.), Bulliard (H.), Cadenat (F.), Chabrol (E.), Debré (R.), Fey (B.), Galliard (H.), Gastinel (P.), Halphen (E.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Lantuejoul (P.), Laroche (G.), Lavier (G.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Mathieu (P.), Mocquot (P.), Monod (R.), Moreau (R.), Moulonguet (P.), Mouquin (M.), Olivier (E.), Pasteur Valléry-Radot, Petit-Dutaillis (D.), Piédeliévre (R.), Quénu (J.), Richet (C.), Senèque (J.), Strohl (A.), Tanon (L.), Verne (J.).

DOYEN : Léon BINET. *Membre de l'Institut*

1^{er} ASSESSEUR : Gaston CORDIER — 2^e ASSESSEUR : Paul CASTAIGNE

I. — PROFESSEURS

1° CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a) PROFESSEURS TITULAIRES :

MM.

Anatomie	DELMAS (A.)
Anatomie pathologique	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	BAUMANN (J.)
Biochimie médicale	JAYLE (M.-F.), SCHAPIRA (G.)
Biologie appliquée à l'Éducat. phys. et aux Sports	CHAILLEY-BERT (P.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Cancérologie médicale et sociale	BERNARD (J.)
Embryologie	TUCHMANN (H.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie (Lariboisière)	JOANNON (P.)
Histologie	GIROUD (A.)
Hygiène et médecine préventive	BOYER (J.)
Médecine du Travail	DESOLLE (H.)
Médecine légale	DEROBERT (L.)
Microbiologie (Bactériologie et virologie)	FASQUELLE (R.)
Parasitologie	BRUMPT (L.-C.)
Pathologie chirurgicale	LAURENCE (G.)
Pathologie exotique	N...
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale	N...
Pathologie respiratoire	TURIAF (J.)
Pathologie et thérapeutique générales	BOUDIN (G.)
Pharmacologie	CHEYMOL (J.)
Physiologie	BINET (L.), BARGETON (D.)
Physiologie et pathologie obstétricale	LEPAGE (F.)
Physique médicale	DOGNON (A.), DJOURNO (A.)
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale	CAUCHOIX (J.)
Thérapeutique	CONTE (M.)
Thérapeutique appliquée	LAMOTTE (M.)

b) PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL :

Biochimie médicale	DESGREZ (P.), POLONOVSKI (J.)
Biologie médicale	BOURLIÈRE (F.)
Hygiène et médecine préventive	DEPARIS (M.)
Pathologie chirurgicale	
Pharmacologie	LÉVY (Mlle J.)
Physiologie	PARROT (J.)
Physique médicale	KELLERSHOHN (L.)

2° CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a) PROFESSEURS TITULAIRES :

MM.

Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)	REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)	SOULIÉ (P.)
Cliniques chirurgicales :	
<i>Beaujon</i> : LORTAT-JACOB (J.-L.) — <i>Cochin</i> : LÉGER (L.), ABOULKER (P.) — <i>Hôtel-Dieu</i> : PATEL (J.) — <i>Pitié</i> : CORDIER (G.) — <i>Saint-Antoine</i> : GOSSET (J.) —	
<i>Salpêtrière</i> : SICARD (A.) — <i>Tenon</i> : OLIVIER (Cl.)	
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants Malades)	FÈVRE (M.)
Clinique chirurgicale orthopéd. et traumat. (Cochin)	MERLE D'AUBIGNÉ (R.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais) ..	GAUDART D'ALLAINES (F. DE)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laënnec) ..	MATHEY (J.)
Clinique endocrinologique (Pitié)	DECOURT (J.)
Clinique de Génétique médicale (Enfants-Malades) ..	LAMY (M.)
Clinique gynécologique (Broca)	HUGUIER (J.)
Clinique des maladies cutanées et syphilit. (St-Louis)	DEGOS (R.)
Clinique des maladies des Enfants (Enfants-Malades)	CATHALA (J.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard) .	MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)	DELAY (J.)
Clinique des maladies métaboliques (Necker)	HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)	MARCHAL (G.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)	CASTAIGNE (P.)
Cliniques médicales :	
<i>Boucicaut</i> : MILLIEZ (P.) — <i>Broussais</i> : LENÈGRE (J.) — <i>Cochin</i> : JUSTIN-BESANÇON (L.), BROUET (G.) — <i>Hôtel-Dieu</i> : BARIÉTY (M.) — <i>Lariboisière</i> : SÈZE (S. DE) —	
<i>Pitié</i> : DREYFUS (G.) — <i>Saint-Antoine</i> : KOURILSKY (R.)	
Clinique d'hydrologie et de climatologie (Bichat) ..	DEBRAY (C.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)	GENNES (L. DE)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel-Dieu)	DEROT (M.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	DAVID (M.)
Clinique neurologique (Salpêtrière)	GARCIN (R.)
Cliniques obstétricales :	
<i>Baudelocque</i> : LACOMME (M.) — <i>Foch</i> (Suresnes) : MERGER (R.)	
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal) .	VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)	RENARD (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière) ..	AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)	LELONG (M.)
Clinique de pédiatrie sociale (Enfants-Malades) ..	MARIE (J.)
Clinique de pneumo-ptisiologie (Laënnec)	BERNARD (E.)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière)	MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)	COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Pitié)	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard) ..	ROUX (M.)
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine) ..	LEMAIRE (A.)
Clinique toxicologique	GAULTIER (M.)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique	PADOVANI (P.)
Sémiologie médicale	DOMART (A.)
Sémiologie et clinique chirurgicales	POILLEUX (F.)
Clinique urologique (Necker)	COUVELAIRE (R.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)	TURPIN (R.)

b) PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL :

Médecine	BOUR (H.), LHERMITTE (F.), PEQUIGNOT (H.)
------------------	--

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGREGES ET MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES

Anatomie :

MM. CABROL (C.); COUINAUD (C.);
GILLOT (C.); OLIVIER (G.), *pr. s. ch.*

Anatomie pathologique :

Mlle GAUTHIER-VILLARS (P.), *pr. s. ch.*; MM. ABELANET (R.); CHOMETTE (G.); GOUYGOU (Ch.), *m. conf.*; NEZELOFF (Ch.); ORCEL (L.); PAILLAS (J.).

Anesthésiologie :

MM. KERN (E.); VOURCH (G.).

Bactériologie :

MM. BARBIER (P.), *pr. s. ch.*; CHRISTOL (D.); LE MINOR (L.); TOURNIER (P.).

Biochimie médicale :

MM. BAULIEU (Et.), *m. conf.*; BOURILLON (R.); CARTIER (P.); DREYFUS (J.-Cl.); GONNARD (P.); KRUH (J.); JEROME (H.).

Biologie appliquée à l'Education Physique et aux Sports : M. PLAS (F.).

Carcinologie :

MM. BOIRON (M.); DENOIX (P.); MATHÉ (G.); SELIGMANN (M.).

Dermato-Syphiligraphie :

MM. CIVATTE (J.); DUPERRAT (B.).

Electro-Radiologie :

M. LEDOUX-LEBARD (G.).

Hématologie :

MM. BESSIS (M.); BILSKI-PASQUIER (G.); DAUSSET (J.); DUHAMEL (G.).

Histologie :

MM. COUJARD (R.), *pr. s. ch.*; MAROIS (M.); RACADOT (J.).

Hydrologie :

MM. BESANÇON (F.); CORNET (A.).

Hygiène :

MM. BOYER (J.), *pr. s. ch.*; BLANCHER (G.); Mme CORRE-HURST (L.); SAPIN-JALOUSTRE (H.).

Maladies infectieuses :

MM. BASTIN (R.), *pr. s. ch.*; DUPONT (V.).

Médecine légale :

MM. FOURNIER (E.); GUENIOT (M.); HADENGUE (A.).

Médecine du travail : M. ALBAHARY (C.).

Neuro-chirurgie : M. PERTUISSET (B.).

Neurologie : M. LAPRESLE (J.).

Obstétrique :

MM. GRANJON (A.); HERVET (E.); LE LORIER (G.); LEVY (J.); MORIN (P.); MUSSET (R.); ROBÉY (M.); SENÈZE (J.); SUREAU (C.); THOYER-ROZAT (J.).

Ophthalmologie :

MM. BRÉGEAT (P.); DUBOIS (A.); SARAUX (H.).

Orthopédie :

MM. JUDET (R.); MEARY (R.); POSTEL (M.); RAMADIER (J.).

Oto-rhino-Laryngologie :

MM. DEBAIN (J.); PIALOUX (P.).

Parasitologie :

MM. GOLVAN (Y.); LAPIERRE (J.).

Pathologie chirurgicale :

MM. BARCAT (J.); BINET (J.-P.); CERBONNET (G.); CHATELIN (C.-L.); DUBOST (Ch.); DUBOST (Cl.); FAUREL (J.); FLABEAU (F.); GARBAY (M.); GARNIER (H.); GAUDART-D'ALLAINES (Cl. de); GERMAIN (A.); LATASTE (J.); LOYQUE (J.); MERCADIER (M.); NATALI (J.); PELLERIN (D.); PERROTIN (J.); ROBERT (H.); THOMERET (G.).

Pathologie exotique : M. SCHNEIDER (J.).

Pathologie expérimentale :

MM. BENHAMOU (J.-P.); BERTHAUX (P.); BOIVIN (P.); CROSNIER (J.); HARTMANN (L.); LÉPER (J.), *pr. s. ch.*; MAURICE (J.); MIKOL (Cl.); RICHET (G.).

Pathologie médicale :

MM. AUSSANNAIRE (M.); BOUVIER (J.); BOUVRAIN (Y.); BRICAIRE (H.); BRISSAUD (H.); BROCARD (H.); BUGE (A.); CATINAT (J.); CHRÉTIEN (J.); COBLENTZ (B.); CONTAMIN (F.); COURY (C.); ETIENNE (J.-P.); FREZAL (J.); FRITEL (D.); HENNEQUET (A.); HIMBERT (J.); HOUSSET (E.); LAROCHE (Cl.); LESOBRE (R.); LÉVÊQUE (B.); MACREZ (C.); MOREAU (L.); NICK (J.); ROYER (P.); TOURNEUR (R.); WOLFROMM (R.).

Pédiatrie-Puériculture :

MM. LAFOURCADE (J.); LEPERCQ (G.); MANDE (R.); MOZZICONACCI (P.); POLONOVSKI (C.); ROSSIER (A.); VIALATTE (J.).

Pharmacologie :

MM. BOISSIER (J.); LECHAT (P.).

Physiologie :

MM. BARRES (G.); DEJOURS (P.),
pr. s. ch.; DURAND (J.); GIRARD *m. conf.*; HUGELIN (A.); SCHERRER (J.).

Physique médicale :

MM. CHANTEUR (J.); GOUGEROT (L.),
m. conf., *pr. s. ch.*; GREMY (F.), *m. conf.*; MILHAUD (G.); PELLERIN (P.);
ROUCAYROL (J.-Cl.); TUBIANA (M.),
m. conf.

Pneumo-phthisiologie :

MM. KREIS (B.); MEYER (A.);
RENAULT (P.).

Psychiatrie : M. PICHOT (P.).

Psychiatrie infantile :

MM. DENIKER (P.); DUCHE (D.);
FLAVIGNY (H.).

Rhumatologie : M. DELBARRE (F.).

pr. s. ch.

Stomatologie :

MM. CERNEA (P.); Mme CHAPUT
(A.), *m. c. agr.*; M. GRELLET (M.).

Thérapeutique :

MM. CHASSAGNE (P.); MARCHE (J.).

Urologie :

MM. AUVERT (J.); MOULONGUET (A.);
QUENU (L.).

III. — PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

A TITRE PERMANENT

Anatomie : M. DEBEYRE (J.).

Clinique chirurgicale : VERNE (J.-M.).

Clinique médicale :

MM. PERRAULT (M.); RAMBERT (P.);
THIEFFRY (S.).

Clinique obstétricale :

MM. GRASSET (J.); MAYER (M.).

Clinique ophtalmologique :

MM. DESVIGNES (P.); OFFRET (G.).

Clinique pédiatrique et puériculture :

M. LAPLANE (R.).

Clinique psychiatrique : M. BARUK (H.).

Clinique urologique : M. KUSS (R.).

IV. — PROFESSEURS DETACHES DANS LES UNIVERSITES ETRANGERES

Bactériologie M. HAUDUROY (P.), *prof. sans chaire*

Pathologie chirurgicale M. RUDLER (J.), *prof. sans chaire*

V. — CHARGES DE COURS D'HYGIENE SCOLAIRE ET UNIVERSITAIRE

M. BOLTANSKI (E.) — M. LAUNAY (C.)

Secrétaire général de la Faculté M. LENA (J.)

Secrétaire principal Mlle CHAINTREUIL (G.)

Conservateur en Chef de la Bibliothèque,

Conservateur du Musée d'Histoire de la

Médecine M. le Docteur HAHN (A.)

Conservateurs Milles DUMAITRE (P.), LE NOIR (G.),

QUIÉVREUX (E.)

Bibliothécaire Mmes CONTET (J.), FORGET (F.),

Mlle LAURENT (H.)

*Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises
dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres
à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.*

A MA MÈRE

En témoignage de ma profonde affection.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA FAMILLE

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MAX-FERNAND JAYLE

Professeur de Biochimie Médicale
à la Faculté de Médecine de Paris
Officier de la Légion d'Honneur

*Avec l'expression de notre très profonde
et respectueuse gratitude pour l'honneur
qu'il nous a fait en acceptant de présider
le jury de cette thèse.*

A MONSIEUR ROBERT HENRY

Chef de Travaux de Biochimie
à la Faculté de Médecine de Paris

*Hommage de vive reconnaissance pour
l'accueil bienveillant qu'il nous a réservé
dans son laboratoire. Sa sollicitude n'a cessé
de nous entourer et de nous encourager au
cours de ce travail qu'il a choisi pour
nous.*

*Qu'il trouve ici le témoignage de notre
inaltérable attachement.*

A MADAME M. LE BALCH

Assistante de Biochimie
à la Faculté de Médecine de Paris

*Nous lui devons une reconnaissance toute
particulière pour nous avoir si utilement
aidé et conseillé tout au long de ce travail.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LUCIEN LÉGER

Professeur de Clinique Chirurgicale
à la Faculté de Médecine de Paris

Chirurgien de l'Hôpital Cochin

Membre de l'Académie de Chirurgie

Chevalier de la Légion d'Honneur

Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre déférente gratitude pour l'accueil qu'il nous a réservé dans son Service à l'Hôpital Henry-Dunant.

A NOS MAITRES
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

A NOS MAÎTRES
DES HOPITAUX DE PARIS

MONSIEUR LE PROFESSEUR HONORAIRE H. BÉNARD

MONSIEUR LE PROFESSEUR PÉQUIGNOT

MONSIEUR LE PROFESSEUR MONOD

MONSIEUR LE DOCTEUR KAPLAN

MONSIEUR LE DOCTEUR BLOCH-MICHEL

MONSIEUR LE DOCTEUR BOURGEOIS

MONSIEUR LE DOCTEUR HEWITT

INTRODUCTION

L'étude des variations relatives des 17-céto-stéroïdes urinaires se révèle d'un intérêt majeur au cours des investigations pratiquées dans certaines affections à retentissement endocrinien. C'est la raison pour laquelle l'étude systématique du fractionnement chromatographique des 17-céto-stéroïdes urinaires a toujours recherché une meilleure séparation de ces différents stéroïdes. Toutefois, il est nécessaire que ces techniques, en élargissant leurs applications, conservent une simplicité opératoire.

Le principe général des méthodes chromatographiques d'adsorption utilise la fixation sur un adsorbant d'un extrait urinaire purifié. L'élution sélective des différents stéroïdes est ensuite effectuée par des mélanges de solvants de polarité croissante. Les 17-céto-stéroïdes sont dosés sur chaque éluat. On obtient ainsi la valeur exacte de chacun des 17-céto-stéroïdes éliminés et l'on peut les comparer avec précision. C'est donc un réel progrès sur les méthodes de fractionnement par chromatographie sur papier qui ne fournissent que des résultats semi-quantitatifs.

Ces chromatographies d'adsorption peuvent être classées en deux groupes, se distinguant essentiellement par le type d'élution réalisé.

1° Méthodes de fractionnement chromatographique sur colonne avec élution discontinue.

Ces méthodes constituent les premières en date.

Ce sont les travaux de DINGEMANSE et al., en 1946 [7], qui inaugurèrent cette série de recherches adaptables aux investigations cliniques. L'adsorption était réalisée sur alumine. Le benzène, à diverses concentrations en éthanol, croissant par paliers successifs, constituait l'éluant. La séparation des stéroïdes était incomplète, mais permettait une appréciation de la DHA, de l'androstérone et de l'étioccholone.

Des perfectionnements furent apportés par ROBINSON et GOULDEN [26], DEVIS [5, 6], ainsi que des précisions sur l'identification des différentes fractions de stéroïdes. D'autres méthodes dérivées furent essayées, dans lesquelles les auteurs ont fait varier adsorbant et éluant. ZYGMUNTOWICZ [33], MARTI [21] réalisèrent une étude analytique des facteurs influençant le fractionnement des 17-céto-stéroïdes et apportèrent certaines améliorations. DINGEMANSE et al. [8] apportèrent des précisions techniques et une identification des fractions.

On peut encore citer les travaux de BAUER [1], WILKINS [31], PLANTIN [24], MIGEON [23], BROOKS [3]. Parallèlement, des micro-méthodes permettant une utilisation plus courante et plus rapide étaient élaborées : POND [25], HENRY et THÉVENET [15], qui élargirent les applications au prégnañdiol et prégnañetriol. Il convient de mentionner encore les travaux de ZIMMERMANN [32], puis ceux de JOHNSEN [17], DROSDOWSKY [9], qui tendent à une nouvelle simplification de ces techniques.

Les difficultés rencontrées dans ces méthodes sans gradient résident dans l'emploi de solvants très polaires qui entraînent des variations très brusques de polarité, d'où les difficultés de séparation, le chevauchement des fractions et la présence de traînées des produits à séparer.

Les alumines utilisées étant de caractère mal défini, donnent des résultats difficilement comparables et une reproductibilité insuffisante.

2° Méthodes de fractionnement chromatographique sur colonne avec gradient d'éluion continu.

Elles furent élaborées dans le but d'améliorer la séparation des 17-céto-stéroïdes dans de nouvelles conditions. Les variations brutales en paliers de polarité des solvants n'existent plus. La base théorique de ces méthodes est la suivante : l'augmentation de polarité s'effectue de façon continue, contrairement aux variations discontinues des techniques précédentes.

Le principe de l'éluion graduelle a été donné par TISELIUS, en 1952 [28]; il fut appliqué aux stéroïdes par LAKSHMANAN et LIEBERMAN, dès 1954 [19]. Ces auteurs employaient une alumine partiellement désactivée par hydratation. Ils cherchèrent à améliorer la qualité de la séparation en modifiant la polarité de l'éluant; ils utilisèrent plusieurs types de gradients obtenus en agissant sur trois variables : volumes, concentration en éthanol et vitesse d'écoulement.

La technique de STAIB [27] est dérivée de la précédente et ne diffère que par une légère modification de l'appareil.

L'inconvénient principal de ces méthodes réside en un réglage difficile de la distribution du solvant le plus polaire dans le solvant de base. En effet, le passage de l'éluant de forte polarité vers le flacon mélangeur se fait au moyen d'un tube capillaire. Le réglage s'effectuant en déplaçant un fil de nickel dans ce tube est relativement difficile. D'autre part, cet appareil à récipients superposés ne permet d'obtenir qu'un gradient de polarité non linéaire. KELLIE et WADE, en 1957 [18], décrivent une méthode utilisant un appareil de réglage plus facile, constitué de deux flacons verticaux contigus réunis par un siphon. Dans cet appareil, le gradient réalisé n'est pas linéaire en raison de l'inégalité de volume des deux récipients. La technique de BROOKSBANK [4] est une variante de la précédente.

La méthode décrite par VESTERGAARD, en 1960 [29], utilise un appareillage assez complexe et de mise au point difficile. Un moteur synchrone, dont le régime est modifié par un changeur de vitesse, réglé au moyen d'une vis, actionne lentement le piston d'une seringue. Celle-ci injecte la solution de plus grande polarité dans un flacon mélangeur où est placée la solution de base. Un tel montage peut théoriquement réaliser différents types de gradients, mais leur mode d'obtention est difficilement codifiable.

Parmi les difficultés rencontrées au cours de l'application de ces méthodes, l'utilisation d'un gradient non linéaire constitue un inconvénient. En effet, le réglage et la reproductibilité de tels gradients sont difficilement obtenus.

Il convient de se reporter à une étude analytique du gradient afin d'en définir les caractères. Le travail de LEBRETON [20] donne une description des divers gradients, ainsi que le principe de leur réalisation technique. L'obtention d'un gradient de concentration nécessite un récipient contenant un liquide de concentration constante et élevée, modifiant progressivement la composition d'un liquide, d'un autre récipient, de concentration plus faible. Suivant l'association de ces deux récipients, soit latérale, soit superposée, suivant la forme et les dimensions relatives de ces flacons, on observe un gradient soit exponentiel ou parabolique concave vers le haut, soit convexe en haut, soit même des variations plus complexes. Cependant, l'utilisation de récipients cylindriques verticaux contigus, de même section, à communication latérale, dont les volumes de solutions restent dans un rapport constant, conduit à un gradient de concentration linéaire. Un tel gradient correspondant à une fonction mathématique simple est facilement accessible à l'étude expérimentale et sa repro-

duction est facile. Les facteurs d'influences créés sont plus limités que dans les gradients complexes. C'est pourquoi, dans la méthode proposée pour le domaine clinique, notre choix s'arrêta à la variation linéaire.

L'élaboration de la méthode définitive comporta donc des essais d'appareillage permettant de réaliser un gradient linéaire et une bonne reproductibilité. Ce problème sera l'objet d'un premier chapitre. Les essais expérimentaux pratiqués, après mise au point du matériel, seront ensuite envisagés dans un second chapitre.

L'exposition de la méthode définitive constituera le troisième chapitre.

Enfin, une étude de quelques applications cliniques viendra illustrer ces conclusions techniques.

Première partie

•

CHAPITRE I

BASES THEORIQUES DU GRADIENT LINEAIRE CALCUL MATHEMATIQUE

Le calcul mathématique, base théorique du gradient linéaire de concentration, va être exposé brièvement ici avant d'en apporter la confirmation expérimentale.

— Les données du problème qui se présentait étaient les suivantes : deux solutions, l'une de faible polarité, et l'autre de plus forte polarité.

Le but à atteindre consistait en l'obtention, à partir de ces deux solutions, d'une variation linéaire de concentration.

— Nous venons de voir que, d'après LEBRETON [20], il était nécessaire, pour réaliser un gradient linéaire, de partir d'un type précis de montage. Nous avons utilisé deux récipients identiques (1) et (2), de même section horizontale, communiquant par la base, un robinet R_1 peut interrompre cette liaison. Une agitation puissante existe dans le flacon (2) de telle sorte que la diffusion du produit de (1) dans l'ensemble de (2) soit immédiate. Le flacon (2) présente un écoulement vers l'extérieur par l'intermédiaire d'un robinet R_2 .

La solution de forte polarité (A) est contenue en (1) et la solution de faible polarité (B) est contenue en (2).

Le volume V étant le même dans chaque récipient, les niveaux présentent une hauteur égale.

Au moment où l'on a dans les vases (1) et (2) une hauteur de liquide H , correspondant aux volumes V , les robinets R_1 et R_2 étant

ouverts, dans (1), le volume V contient 100 % de A ; dans (2), le volume V contient x % de A, et par conséquent :

$$(100 - x) \% \text{ de B}$$

Quand le niveau a baissé de dH , il s'est écoulé un volume de $2 dv$:

$$dv \text{ de A} + B \text{ dans (2)} + dv \text{ de A dans (1)}$$

qui est venu se mélanger dans (2).

Les nouvelles quantités de A et B qui sont alors dans (2) sont les suivantes :

$$\begin{aligned} & \text{— on a perdu } 2 dv (x/100) \text{ de A} \\ & \quad \text{et } 2 dv (100 - x)/100 \text{ de B} \end{aligned}$$

$$\text{— on a gagné } dv 100/100 \text{ de A}$$

on a donc dans le volume restant :

$$\begin{aligned} V - dv : Vx/100 - 2 dv (x/100) + dv 100/100 \text{ de A} \\ \text{et : } V (100 - x)/100 - 2 dv (100 - x)/100 \text{ de B} \end{aligned}$$

On peut évaluer ces quantités en disant que, dans le volume restant $V - dv$, la concentration de A est passée de x % à $x + dx$ %, d'où les équations :

$$V x/100 - 2 dv x/100 + dv 100/100 = (V - dv) (x + dx)/100$$

ou :

$$V (100 - x)/100 - 2 dv (100 - x)/100 = (V - dv) (100 - x - dx)/100$$

L'une ou l'autre de ces équations nous donne :

$$V \frac{dx}{dv} = 100 - x \quad x \text{ fonction de } v$$

La solution de cette équation est :

$$x = 100 - \frac{V}{V_0} (100 - x_0)$$

où x_0 est la concentration initiale de A dans (2) en % pour le volume initial V_0 .

Si nous appliquons, par exemple, au problème ci-dessus les conditions de la méthode définitive :

$$V_0 = 2 \times 105 \text{ ml}$$

$$\text{A dans (1) : benzène} + 1,4 \% \text{ d'éthanol}$$

$$\text{B dans (2) : benzène} + 0,2 \% \text{ d'éthanol, soit } 14,28 \% \text{ de (1)}$$

donc :

$$\begin{aligned} V_0 &= 210 \text{ ml} \\ x_0 &= 14,28 \% \end{aligned}$$

comme :

$$x \% = f(v) = 100 - \frac{85,72}{210} V$$

(V = volume restant dans les récipients)

On a au départ :

$$V = 210 \text{ ml}$$
$$x = 100 - 85,72 \times 210/210 = 14,28 \%$$

(ce qui correspond à 0,2 % d'éthanol)

A mi-volume :

$$V = 105$$
$$x = 100 - 85,72 \times 105/210 = 57,14 \%$$

(ce qui correspond à 0,8 % d'éthanol)

En fin d'expérience :

$$V = 0$$
$$x = 100 - 0 = 100 \%$$

(ce qui correspond à 1,4 % d'éthanol)

Tous les points intermédiaires aux trois points ci-dessus peuvent être calculés de même.

Ces différents points exprimant des pourcentages de concentration pour un volume écoulé peuvent être reportés sur un graphique et se trouvent situés sur une même droite.

La variation du gradient est donc linéaire, et ceci, non seulement avec les données chiffrées de l'exemple reproduit ici, mais la même démonstration peut être réalisée à partir de n'importe quelles concentrations. Ceci nous permettait l'obtention automatique d'un gradient linéaire avec ce type d'appareil, quel que soit le titre en éthanol des solutions.

CHAPITRE II

ELABORATION DE L'APPAREILLAGE

I. — APPAREIL PERMETTANT UN GRADIENT DE CONCENTRATION

Ainsi qu'il a été vu au chapitre précédent, l'obtention pratique d'un gradient linéaire étant réalisée au moyen de deux vases de section identique à communication latérale, c'est à ce type de montage que nous nous sommes arrêtés. Leur volume fut calculé largement en fonction du volume total d'éluant nécessaire.

La mise au point des caractéristiques du tube de communication nécessita quelques essais. L'emploi d'un tube de trop grand diamètre entraînait un reflux dans le flacon donneur, en raison de l'agitation. Ceci même, en créant un étranglement à sa portion terminale. Sa terminaison se trouvait d'abord pariétale, dans la paroi du récipient mélangeur. Puis on le fit prolonger par une portion libre, aboutissant au centre du flacon mélangeur, et s'ouvrant par un orifice ouvert en haut. Ces caractéristiques permettent d'éliminer l'influence de la contre-pression d'agitation rotative s'exerçant contre la paroi du récipient.

L'appareil définitif est entièrement en verre « pyrex » et est constitué de trois parties solidaires (*fig. 1*) :

1° *Deux vases identiques, cylindriques, verticaux.*

Ils sont en situation parallèle, leur fond sur un même plan horizontal.

Leur partie supérieure est ouverte par un rodage conique n° 2, sur lequel s'adapte un bouchon à embout. Une pression d'air additionnelle peut ainsi être répartie également dans les deux flacons, au moyen d'un tube en T.

Les dimensions sont les suivantes :

- diamètre : 50 mm ;
- hauteur de la portion cylindrique : 145 mm ;
- volume : 220 ml.

Une tige pleine solidarise les deux flacons à une distance de 8 cm.

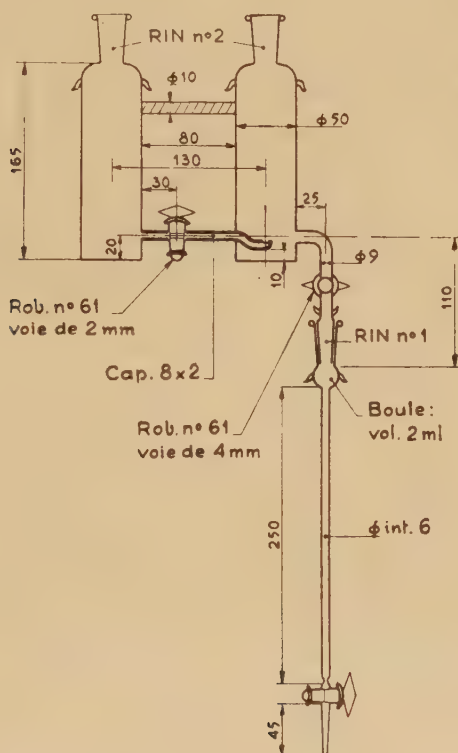


FIG. 1 — Appareil à gradient d'élution. Colonne à chromatographie, en verre calibré (selon R. HENRY)

2° La partie basse de chaque récipient est réunie par un *tube semi-capillaire horizontal* de dimensions suivantes :

- calibre extérieur : 8 mm ; intérieur : 2 mm.

Ce tube présente à sa partie moyenne un robinet rodé, qui permet de mettre ces deux récipients en communication. Il prend origine dans la paroi latérale du flacon donneur, à 15 mm du fond.

Sa terminaison se fait, ainsi qu'il a déjà été vu, par une portion libre au centre du flacon mélangeur par un orifice ouvert en haut.

L'ensemble du trajet est horizontal, origine et terminaison se trouvant à même hauteur.

3° *La tubulure de sortie du flacon mélangeur.*

Son calibre intérieur est de 6 mm. Elle prend origine, à 15 mm du fond, dans la paroi latérale du récipient, diamétralement opposée au tube de liaison. Elle suit un trajet d'abord horizontal, qui se poursuit par un coude à angle droit, puis descend verticalement. Sa terminaison se fait par un robinet rodé (voie de 4 mm) et un ajutage rodé, conique n° 1.

II. — COLONNES

La mise au point des caractéristiques de la colonne à utiliser dans la méthode nécessita de nombreux essais comparatifs de différents types de colonnes. La réalisation de cette étude comporta donc une variable : la colonne, les autres facteurs restant constants. Le critère qualitatif fut la perfection du fractionnement des stéroïdes.

Une colonne de calibre 4,1 mm, du type décrit par HENRY et THÉVENET, en 1953 [15], chargée à 2,20 g d'alumine et dont les fractions d'élution avaient un volume de 2 ml, fut comparée à une colonne de calibre 6 mm, préconisée par KELLIE [18], chargée à 6 g d'alumine et dont les fractions d'élution avaient un volume de 3 ml. Les résultats obtenus étaient bons et assez comparables avec les deux types de colonne. Cependant, avec la colonne de calibre 6 mm, la qualité du fractionnement était quelque peu meilleure : la densité optique s'annulant le plus souvent entre les clochers correspondant aux différentes fractions de 17-céto-stéroïdes, les tubes de séparation étaient plus nombreux et les pics plus aigus et réguliers. Avec cette dernière colonne il y a possibilité d'une charge plus grande en stéroïdes. En effet, 1.000 μ g est déjà une charge élevée pour la petite colonne de 4,1 mm. C'est pourquoi, notamment en ce qui concerne la détermination des stéroïdes présents en faible quantité dans un extrait (tels que 11-céto-androstérone), l'utilisation de la colonne 6 mm s'imposait.

Une seconde série d'expériences comparatives fut effectuée, portant sur les qualités respectives de la colonne calibrée 6 mm précédente et un type de colonne calibrée 6 mm, de caractéristiques rigoureusement standardisées. En effet, des anomalies dans la reproductibilité s'observaient assez fréquemment avec les colonnes non standardisées. A l'origine, en effet, il s'agissait d'une colonne de 6 mm,

de calibrage non rigoureux et présentant des volumes morts relativement importants sus et sous-jacents au robinet où pouvaient se produire des mouvements de convection ou de turbulence, facteurs de remélange. D'autre part, la hauteur de la colonne ne doit dépasser que légèrement la portion garnie d'alumine, afin d'éviter des modifications de gradient. C'est pourquoi, dans la colonne 6 mm définitive, les caractéristiques subirent une standardisation stricte (voir *fig. 1*) :

- calibrage rigoureux de 6 mm ($\pm 0,01$ mm);
 - volumes morts réduits ;
 - hauteur de la colonne ne dépassant que de peu la zone utilisée par l'alumine ;
 - longueur de la portion cylindrique : 250 mm ;
 - longueur de la zone garnie de 6 g d'alumine : 180 mm.
- a) La partie supérieure comporte un rodage normalisé n° 1, pouvant s'adapter au rodage de la tubulure de l'appareil ou à une ampoule-réservoir ;
- b) La partie inférieure présente un étranglement constitué de trois pointes de verre, permettant de retenir la petite boule de coton arrêtant l'alumine. Ensuite, un robinet rodé ferme cette portion qui se termine par une tubulure effilée. Il convient d'insister de nouveau sur la réduction maxima des espaces morts dans la région de l'étranglement et au niveau de la tubulure de sortie.

Une telle colonne permet d'observer une excellente reproductibilité, ainsi que des pics plus aigus et réguliers. C'est une colonne de ce type qui est employée dans la méthode définitive.

Il faut signaler une série d'expériences faites avec une colonne calibrée de 11 mm. Mais ici plusieurs facteurs sont obligatoirement modifiés par rapport à la colonne de 6 mm :

- charge : 30 g d'alumine ;
- volume d'éluant plus grand : 235 ml (volume maximum) en chaque flacon ;
- fractions de 4,5 ou 7,5 ml.

Au cours de ces essais, nous avons cherché à maintenir une pente de gradient identique à celle donnant de bons résultats avec la colonne calibrée à 6 mm. Puis des essais furent faits avec des solutions donnant une diminution ou une augmentation de la pente. Jusqu'à présent, les résultats ne sont pas satisfaisants et la séparation reste très insuffisante. L'interprétation de ces échecs est difficile. Plusieurs hypothèses peuvent être invoquées, telles que modification du gradient dans la colonne en raison du grand volume d'alumine ou remélange.

Le but de ces tentatives d'utilisation d'une colonne de plus grandes dimensions était de permettre une charge plus importante en stéroïdes. Cette colonne aurait rendu possible de façon simple des chromatographies préparatives pour l'étude de certains stéroïdes.

Notons qu'il n'est pas toujours possible de transposer les données d'une technique établie pour une colonne d'un certain diamètre à une autre colonne de diamètre différent.

III. — APPAREILS ANNEXES

- AGITATEUR MAGNÉTIQUE, comprenant :

- Un moteur synchrone tournant à 300 tours par minute, entraînant la rotation d'un aimant. Des vitesses plus grandes sont inutiles si on se limite au volume d'éluant adopté à la colonne de 6 mm de la méthode définitive.

- Un barreau magnétique de longueur de 28 mm sur 8 mm de diamètre, enrobé dans une gaine de Téflon, tournant au fond du flacon mélangeur.

- PRESSION D'AIR ADDITIONNELLE :

Elle est réalisée au moyen d'air comprimé, dont le débit est réglé par un détendeur muni d'un robinet et d'un manomètre. L'utilisation d'un tube en T permet d'exercer une pression égale en surface des deux solutions éluantes. La pression est réglée d'après la vitesse de passage du mélange éluant et reste dans les conditions de notre technique inférieure à 100 g. La source d'air comprimé peut être une bouteille avec un détendeur ou une petite pompe à moteur, le réglage de pression étant obtenu par un robinet de fuite.

- MONTAGE DE L'ENSEMBLE :

Un support a été réalisé, permettant le « positionnement » dans les différents plans de l'appareil à chromatographie et son installation avec le maximum de simplification.

- COLLECTEUR DE FRACTIONS :

L'appareil utilisé est un collecteur automatique décrit par R. HENRY et al. [13] et récemment modifié.

Les fractions déterminées par pesée sont recueillies dans des tubes calibrés en diamètre et longueur et tarés. Lorsque le poids choisi est atteint, le fléau du trébuchet intercepte un faisceau lumineux tombant normalement sur une cellule photo-electrique. Cette dernière ne débitant plus, un relais électrique se ferme et permet l'avancement du tube suivant.

Deuxième partie

LES ESSAIS EXPERIMENTAUX

Les essais expérimentaux ont comporté, d'une part l'étude expérimentale de la linéarité du gradient permettant de confirmer les bases théoriques relatives à l'élaboration de l'appareil générateur de gradient ; d'autre part, l'étude expérimentale de la chromatographie des 17-céto-stéroïdes par la méthode adoptée.

CHAPITRE 1

ETUDE EXPERIMENTALE DE LA LINEARITE DU GRADIENT

Une première expérience fut réalisée au moyen de solutions colorées prenant la place dans l'appareil des solutions éluantes habituelles. La mesure photométrique des fractions recueillies avait déjà mis en évidence le type linéaire du gradient de concentration obtenu.

Mais c'est au moyen de solutions de benzène dans l'éthanol avec lecture finale au spectrophotomètre à U.V. que la démonstration du caractère linéaire de la variation acquit toute sa précision.

Cette technique fut utilisée car elle permettait de se mettre dans les conditions d'une chromatographie comportant colonne et alumine. Ainsi, on pouvait apporter une vérification de la bonne linéarité du gradient, tout en conservant les modalités techniques de la chromatographie des 17-céto-stéroïdes à l'exception des deux points suivants :

- la colonne d'alumine était dépourvue de stéroïdes, inutiles ici et pouvant perturber la lecture en U.V. ;
- les solutions utilisées étaient de type inversé par rapport aux éluants habituels, c'est-à-dire qu'elles se composaient de benzène dans l'éthanol au même titre et à des titres voisins des solutions d'éthanol dans le benzène, utilisées pour l'élution des stéroïdes. Ceci, afin de permettre une mesure au spectrophotomètre à U.V. du benzène : la densité optique observée étant proportionnelle à la concentration en benzène de chaque fraction recueillie.

La colonne d'alumine était préparée dans l'éthanol absolu.

La solution faiblement concentrée fut essayée à des titres de 0,1 %, 0,2 %, 0,25 % en benzène dans l'éthanol.

La solution fortement concentrée fut employée au titre de 1,4 %.

Les volumes utilisés restaient les mêmes dans ces différentes expériences et identiques à ceux des chromatographies habituelles.

Les fractions recueillies en fin d'expérience furent mesurées au spectrophotomètre à U.V., après vérification du maximum d'absorption. Le graphique obtenu en reportant en ordonnée les valeurs des densités optiques observées et en abscisse le numéro de la fraction correspondante, permet à chaque fois d'obtenir une droite (fig. 2).

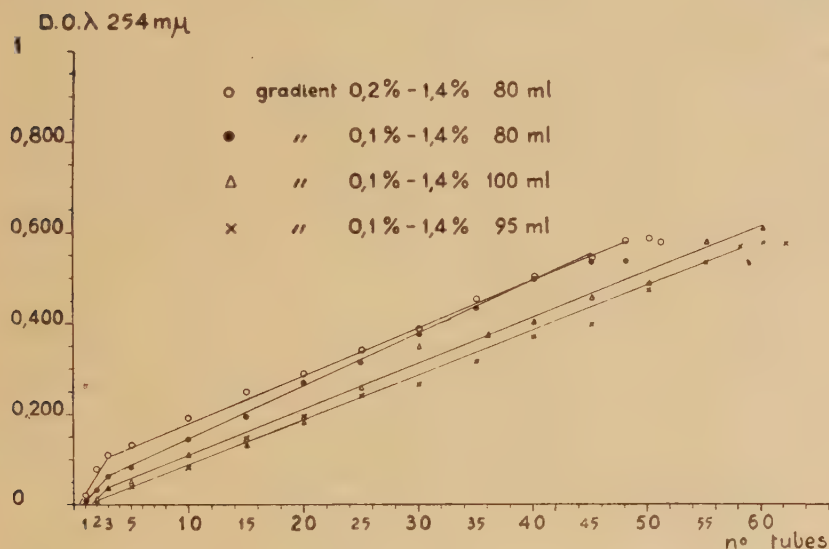


FIG. 2 — Etude expérimentale de la linéarité du gradient d'élution dans différentes conditions

Dans ces conditions, l'appareil élaboré nous permettait d'obtenir un gradient linéaire dont nous pouvions faire varier la pente en modifiant les concentrations initiales.

Ainsi, nous pouvions expérimenter avec cet appareil les différentes possibilités d'élution des 17-céto-stéroïdes.

CHAPITRE II

ETUDE EXPERIMENTALE DE LA CHROMATOGRAPHIE

Une expérimentation des principaux facteurs influençant la séparation chromatographique des 17-céto-stéroïdes a permis de préciser les conditions optima à adopter dans la méthode définitive.

Les facteurs étudiés furent :

- le rôle de l'alumine ;
- la température de la colonne ;
- le rôle de la concentration en éthanol des solutions d'élution ;
- l'influence du débit de la colonne ou vitesse d'écoulement ;
- le volume des fractions selon la colonne et pour une même colonne ;
- la charge en stéroïdes minima et maxima.

Cette expérimentation fut réalisée en prenant comme variable le facteur à étudier, les autres conditions restant constantes ou peu différentes.

I. — ÉTUDE DES ALUMINES

Il convient de souligner le caractère très différent et mal connu des alumines, suivant leurs propriétés d'adsorption et leur hydratation.

Cette étude fut menée en prenant comme variable le type d'alumine (provenance, marque, lot de fabrication) d'une part ; son hydratation d'autre part. Les autres facteurs pouvant influencer la chromatographie restent constants ou très voisins.

A) LE TYPE D'ALUMINE

Les alumines expérimentées furent :

- alumine Merck standard, avec comparaison de différents lots de fabrication ;
- alumine Merck neutre ;
- alumine Woelm neutre ;
- alumine Woelm basique (deux lots étudiés).

L'alumine Merck standard (alumine standardisée selon des normes fournies par le fabricant) donna des résultats inégaux suivant le lot. La séparation obtenue, le plus souvent excellente, pouvait être médiocre ou très insuffisante avec présence de blocs groupant deux clochers (notamment, bloc DHA-androstérone). Dans ces derniers cas, on notait une amélioration en augmentant l'hydratation.

L'alumine Merck neutre donna d'une façon générale une bonne séparation.

L'alumine Woelm neutre fournit de même des résultats satisfaisants.

L'alumine Woelm basique permit un excellent fractionnement, notamment en ce qui concerne les quatre derniers stéroïdes (oxygénés en 11).

Deux lots de fabrication furent étudiés et, dans tous les cas, la constance et l'excellente reproductibilité du chromatogramme firent adopter ce type d'alumine pour la méthode définitive.

Au total, l'interprétation précise de ces inégalités de résultats suivant les diverses alumines est difficile. La constance de la structure physico-chimique et par suite des propriétés d'adsorption permet, seule, d'obtenir une parfaite reproductibilité.

B) L'HYDRATATION

Cette étude fut réalisée avec divers degrés d'hydratation. L'alumine est d'autant plus désactivée que sa teneur en eau est forte.

Des essais pratiqués avec une hydratation de 4,5 % donnèrent satisfaction.

Cependant, avec une teneur en eau plus forte à 6,50 %, on obtient une amélioration sensible dans la qualité du chromatogramme.

Quelques cas particuliers, intéressants du point de vue théorique, furent expérimentés. Notamment, le lot n° 919.115 de l'alumine Merck standard donnant de mauvais résultats à 6,50 % d'eau (bloc complet DHA-androstérone), permit une bonne séparation à 10 % d'eau.

L'interprétation du rôle de l'hydratation repose sur l'intervention déterminante du degré de polarité. Une alumine est de caractère d'autant plus polaire que son hydratation est faible. La désactivation, plus ou moins importante, obtenue en accroissant le pourcentage d'eau fixée sur l'alumine, permet alors une élution plus progressive et graduelle des stéroïdes adsorbés.

On a retenu, pour la méthode définitive, le taux d'hydratation de 6,50 % avec l'alumine Woelm basique.

II. — ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LE FRACTIONNEMENT

L'étude de l'influence de la température de la colonne d'alumine sur la qualité du fractionnement donne des résultats intéressants.

La réaction physico-chimique alumine-éthanol existant lors de l'élution est exothermique (ce caractère a même été utilisé comme mode de classification des aluminés). Aussi paraissait-il utile d'expérimenter le rôle d'une modification extérieure de la température de la colonne d'alumine.

Sa réalisation a été menée à bien en adaptant un manchon à circulation d'eau entourant la portion cylindrique de la colonne.

La variable étudiée fut la température de l'eau circulant autour de la colonne, cette température étant rigoureusement maintenue constante au cours de toute l'élution. Les autres conditions de déroulement des différentes chromatographies comparatives pratiquées restant strictement identiques, les résultats s'exprimèrent par l'aspect du diagramme obtenu (voir *fig. 3*).

Le chromatogramme de base établi à partir d'une expérience sans circulation d'eau, donc à température du laboratoire, servit de critère de comparaison. Pour ce faire, on utilisa un même extrait urinaire humain normal qui servit pour toute la série d'expériences.

Le chromatogramme obtenu avec une circulation d'eau à 13° C se distingua du précédent par les caractères suivants :

- départ plus tardif (trois tubes de décalage);
- resserrement des premiers pics (incomplète séparation DHA-androstérone);
- meilleure séparation des quatre derniers stéroïdes (oxygénés en 11); notamment, excellente dissociation de 11-céto-étiocholanolone et 11-hydroxy-androstérone.

Le chromatogramme obtenu avec une circulation d'eau à la température constante de 30° C révéla les modifications suivantes par rapport à l'aspect de base :

- départ un peu plus précoce ;
- pics plus larges et plus aplatis, avec mauvais résultat dans la zone des 17-céto-stéroïdes oxygénés en 11 (bloc 11-céto-étiocholanolone - 11-hydroxy-androstérone).

Ces résultats confirment ceux de VESTERGAARD [30].

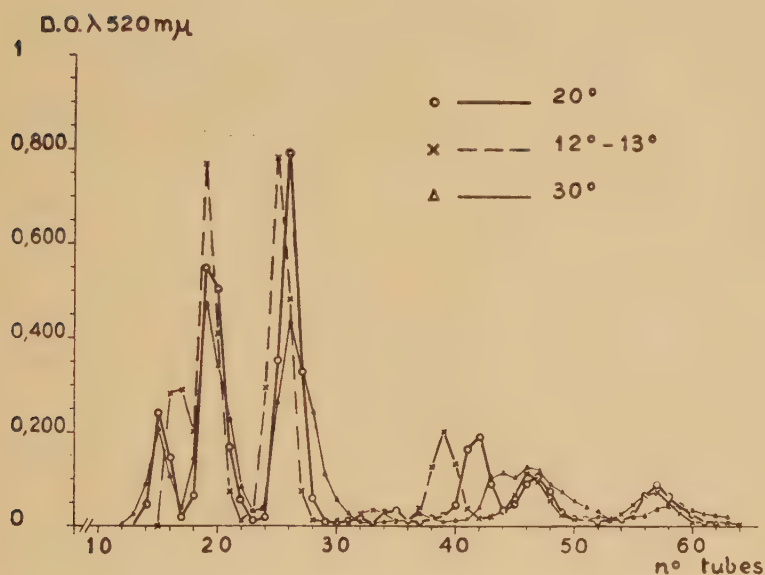


FIG. 3 — Influence de la température de la colonne d'alumine sur le fractionnement

En conclusion, l'application pratique de ces constatations serait d'effectuer la chromatographie à température ordinaire pour les trente premières fractions, puis en établissant alors une circulation d'eau à 13° C jusqu'à la fin. Néanmoins, les essais étudiés dans le présent travail ont été pratiqués à la température du laboratoire : 18° C-20° C.

III. — ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DES SOLVANTS D'ÉLUTION SUR LA SÉPARATION DES STÉROIDES

La solution de plus fort titre en éthanol enrichit progressivement la solution de faible titre et réalise ainsi un gradient de concentration. Celui-ci est, comme il a été vu, de type linéaire. La pente de ce gradient dépend directement du titre en éthanol des solutions utilisées.

Le rôle de cette pente sera tout d'abord envisagé en modifiant celle-ci dans les deux sens : relèvement ou abaissement.

Par ailleurs, une modification dans les volumes des solutions utilisées n'est pas sans retentissement sur le chromatogramme.

Mais il convient de tenir compte, à côté de ces deux points, de l'influence importante de la concentration initiale de la solution éluante.

Ces trois aspects de l'élution seront évoqués successivement.

A) RÔLE DE LA PENTE DU GRADIENT

La pente peut être modifiée dans le sens de l'augmentation, soit en augmentant la concentration de la solution riche, soit en diminuant la concentration de la solution la plus diluée. Une diminution de la pente est obtenue par le procédé inverse.

Une augmentation ou une diminution de la pente signifie, par conséquent, un accroissement plus ou moins rapide de la polarité.

L'expérimentation de ce facteur a été réalisée en modifiant diversement la pente du gradient, tout en conservant constantes les autres conditions de la chromatographie. Une augmentation progressive de la pente a été réalisée ; les conséquences de cette modification étant appréciées sur l'aspect du chromatogramme ; essentiellement l'étendue de la zone de passage des stéroïdes :

- 0,1 % et 1 % : chromatogramme en 60 fractions ;
- 0,1 % et 1,4 % : chromatogramme en 50 fractions ;
- 0,1 % et 1,6 % : chromatogramme en 45 fractions.

Cet accroissement de la pente entraîne un resserrement global du chromatogramme, et plus précisément, en ce qui concerne les trois premiers pics, un rapprochement progressif de la base est observé.

Si on augmente la pente de façon trop importante, la séparation totale n'est plus obtenue : il y a chevauchement.

En ce qui concerne les quatre derniers stéroïdes, l'élévation de la pente permet d'obtenir des pics plus aigus et réguliers ; l'élution traîne moins. Mais au delà d'une certaine valeur, on note un resserrement important et la non séparation de la 11-céto-étiocholane, de la 11-hydroxy-androstérone.

B) ROLE DU VOLUME DES SOLUTIONS UTILISEES

Le facteur pente n'est, en effet, pas à considérer isolément. C'est ainsi que pour une même pente du gradient, et dans des conditions strictement identiques par ailleurs, si l'on utilise des volumes différents (le volume reste de toutes manières égal dans les deux flacons), le résultat est très modifié. Par exemple, une expérience avec des solutions à 0,2 % et 1,4 % utilisées sous le volume de 105 et 105 ml permet un très bon fractionnement des stéroïdes.

Par contre, l'utilisation de solutions à 0,2 % et 3,5 % sous le volume de 215 et 215 ml, réalisant pourtant une même pente de gradient, ne fournit qu'une très mauvaise séparation, ainsi que des pics très aplatis.

Cependant, il convient de tenir compte dans l'interprétation de ces faits des plus grandes difficultés de mélange lorsqu'on utilise un volume important.

C) ROLE DE LA CONCENTRATION DE BASE

La richesse en éthanol de la solution faiblement concentrée influence de façon importante l'aspect du chromatogramme.

a) FORTE CONCENTRATION DE DÉPART :

Le départ du chromatogramme ou début du premier pic sur le graphique est d'autant plus précoce que cette solution est de plus forte concentration en éthanol. En ce cas, la concentration éluante est, en effet, plus vite atteinte.

Cependant, en augmentant ce taux, on arrive rapidement à un resserrement du chromatogramme avec chevauchement des différentes fractions.

b) CONCENTRATION DE DÉPART NULLE :

Inversement, l'utilisation d'une solution de départ constituée uniquement de benzène pur donne de moins bons résultats que celle

d'une solution contenant une petite quantité d'éthanol. Le départ du chromatogramme est tardif. La séparation est moins complète.

En conclusion, les nombreux essais effectués ont permis de préciser les concentrations optima et les volumes des éluants donnant les meilleurs résultats : solutions de benzène à 0,2 % et 1,4 % d'éthanol, le volume utilisé de chacune étant de 105 ml.

IV. — ROLE DE LA VITESSE D'ÉCOULEMENT OU DÉBIT DE LA COLONNE

L'influence de la vitesse d'écoulement du mélange éluant dans la colonne a été précisée par de nombreux essais. Les autres conditions restant constantes, ce facteur fut modifié dans le sens d'une accélération ou d'un ralentissement. Le critère fut la qualité du chromatogramme. Le débit optimum a pu ainsi être établi :

a) Pour la colonne de calibre 4,1 mm, il est de 10 à 12 ml par heure. Avec un débit de 16 ml, la séparation tend à devenir médiocre et pour 24 ml, elle est insuffisante et les pics moins aigus.

b) Pour la colonne de 6 mm calibrée de la méthode définitive, il se situe aux environs de 18 ml à l'heure (environ 7 fractions de 2,5 ml), mais un débit restant compris entre 15 et 25 ml permet un bon fractionnement.

V. — INFLUENCE DU VOLUME DES FRACTIONS SUR LA QUALITÉ DU CHROMATOGRAMME

L'étude en a été faite sur deux types de colonnes, afin de déterminer le volume optimum pour chacune.

En ce qui concerne la colonne calibrée de 4,1 mm, il est de 2 ml. Pour 3 ml, on note une moins bonne séparation avec resserrement des pics à la base.

En ce qui concerne la colonne de 6 mm calibrée, le volume optimum est de 2,5 ml. Pour 3 ml, le fractionnement est très légèrement moins net.

En conclusion, dans la méthode définitive, le volume des fractions a été fixé à 2,5 ml (2,12 g).

VI. — ÉTUDE DE LA CHARGE EN STÉROIDES DE LA COLONNE

L'étude a été faite sur les deux mêmes types de colonne que précédemment, avec des extraits purifiés n'entraînant qu'un minimum de surcharge par des impuretés.

En ce qui concerne la colonne de 4,1 mm contenant 2,20 g d'alumine :

- charge maxima : 2.000 μg pour cette quantité, on observe déjà une séparation non totale entre les pics ;
- charge minima : avec 150 μg en trois stéroïdes (mélange de DHA, androstérone, étiocholanolone), on obtient un bon résultat ;
- charge normale : 500 à 1.000 μg .

En ce qui concerne la colonne 6 mm calibrée contenant 6 g d'alumine :

- charge maxima : 5.000-6.000 μg ; pour cette quantité, la séparation est déjà de moins bonne qualité ;
- charge minima : 500 μg si on considère un extrait, car les stéroïdes les moins abondants seraient en deçà en trop faible quantité (11-céto-androstérone par exemple) pour une appréciation colorimétrique valable ;
- charge optima : 1.000 à 3.000 μg .

En conclusion, le rapport stéroïde/alumine maximum se situe aux environs de 1/2.000^e.

Dans la méthode définitive, la quantité d'extrait utilisée est habituellement fixée à 1.000 μg , afin de rester dans les limites de concentration des fractions compatibles avec une bonne précision de la mesure photométrique.

Troisième partie

TECHNIQUE

Nous étudierons tout d'abord la technique suivie pour la préparation d'un extrait purifié.

Ensuite, nous décrirons la méthode de chromatographie finalement retenue après confrontation des faits expérimentaux étudiés précédemment.

CHAPITRE I

PREPARATION DE L'EXTRAIT

PRINCIPE

- Hydrolyse enzymatique par le suc d'*Helix pomatia*, réalisée dans les conditions optima.
- Extraction au trichloréthylène.
- Purification maxima afin d'éliminer les impuretés pouvant perturber la chromatographie.

MATERIEL

- Thermostat à 37° (¹).
- Agitateur rotatif : appareil de R. HENRY [11] (²).
- Allonges en verre : 37 mm de diamètre intérieur ; longueur utile : 400 mm.
- Evaporateur : fonctionnant sous pression réduite à basse température (³).

REACTIFS

— *Trichloréthylène technique* redistillé lentement en éliminant 5 % du début de la distillation et 5 % à la fin. Conservé en flacons bruns. Contrôler la neutralité de ce solvant avant l'emploi. Son altération se traduirait par une réaction acide.

1. JOUAN, 113, boulevard Saint-Germain, Paris-6°.

2. MECASERTO, 126, boulevard d'Alsace-Lorraine, Le Perreux (Seine).

3. Ev. sous vide Büchi : SOFRANIE, 40, rue d'Artois, Paris-8°.

- *Solution tampon de pH 5.2, 2 M*, obtenue par mélange de :
 - 79 ml de solution 2 M d'acétate de sodium (solution d'acétate de sodium 2 M = 164 g/l);
 - et 21 ml de solution 2 M d'acide acétique (solution d'acide acétique 2 M = 120 g/l).

— *Acétate de baryum* : solution à 25 % (p/v). Préférer l'acétate de baryum au chlorure de baryum apportant des ions Cl^- inhibiteurs de la sulfatase.

— *Baryte hydratée R.P. pour analyses*. Pulvériser au moment de l'emploi. Verser cette poudre lentement dans la colonne contenant le trichloréthylène.

— *NaOH 2 N*.

— *Suc d'*Helix pomatia** [14, 16] trouvé dans le commerce, purifié et titré en glycuronidase et sulfatase (¹) :

$$1 \text{ ml} = \begin{cases} 100.000 \text{ U. Fishman de glycuronidase;} \\ 50.000 \text{ U.P.P.S. de sulfatase.} \end{cases}$$

PRISE D'ESSAI

Urines de vingt-quatre heures recueillies sur antiseptiques : Merseptyl (à la concentration de 1/10.000^e d'urine) ou cyanure de mercure en ampoules : 0,02 g pour les urines de vingt-quatre heures.

La chromatographie étant habituellement effectuée sur 1 mg de stéroïdes, la prise d'essai est calculée en fonction de cette valeur. Cependant, dans les cas où une chromatographie sur papier devrait compléter la détermination, il y a lieu de réaliser la séparation sur alumine de 2 mg de stéroïdes au minimum, afin de permettre le prélèvement d'une portion aliquote des fractions de la chromatographie.

HYDROLYSE

Nous utilisons l'hydrolyse enzymatique en raison de ses avantages : quantitative, non agressive et sans artéfacts.

— Traiter la prise d'essai par 10 % de la solution d'acétate de baryum à 25 %, amener le mélange à pH 11,5 au moyen de NaOH 2 N et laisser en contact dix minutes (l'acétate de baryum provoque la précipitation des phosphates et sulfates minéraux qui sont fortement inhibiteurs de la sulfatase). Centrifuger.

1. Ind. Biol. Franç., 35, rue du Moulin-de-Cage, Gennevilliers (Seine).

— Amener le surnageant à pH 5,2 avec de l'acide acétique et ajouter 10 % en volume de tampon acéto-acétate 2 M.

— Soumettre à l'action du suc d'*Helix pomatia* (1.000 unités Fishman par ml d'urine) pendant vingt-quatre heures à 37°.

Ainsi, tous les 17-céto-stéroïdes sont hydrolysés ; seuls les sulfates de 3- α -stéroïdes, dont le sulfate d'androstérone, ne sont pas hydrolysés.

EXTRACTION ET PURIFICATION

L'urine hydrolysée est soumise à trois extractions successives de dix minutes avec un volume de trichloréthylène égal à 1/4 du volume urinaire traité pour chaque opération. Ces extractions sont pratiquées dans des allonges cylindriques sur agitateur tournant [11].

Après filtration et distillation, le résidu est repris par le trichloréthylène.

Nous insistons sur la nécessité de purifier l'extrait pour ne pas surcharger la colonne d'alumine par des impuretés.

La purification est commencée par passage sur colonne de baryte.

Un lavage est alors opéré avec $V_1/3$ de NaOH 2 N.

Un second lavage avec $V/3$ d'eau distillée termine les temps de purification.

Après filtration et distillation à sec, sous vide partiel à 40°, l'extrait est alors repris par l'éthanol à 96°.

Le dosage des 17-céto-stéroïdes est alors effectué sur une partie aliquote, afin de déterminer le volume de la solution d'extrait correspondant à 1 mg de stéroïdes, quantité habituellement utilisée pour une chromatographie.

ETUDE DE L'HYDROLYSE

Dans les conditions d'hydrolyse que nous avons adoptée, les sulfates d' α -stéroïdes ne sont pas hydrolysés par le suc d'*Helix pomatia*.

En utilisant la méthode de LIEBERMAN, reprise par BAULIEU [2], nous avons voulu étudier la différence entre ces deux types d'hydrolyse. D'une part du point de vue quantitatif, et d'autre part du point de vue qualitatif.

Par ailleurs, nous savons que le précipité d'hydroxyde de baryum ayant pour but d'éliminer les substances inhibitrices des enzymes hydrolysants, peut entraîner des traces de stéroïdes conjugués.

Nous avons réalisé l'expérience suivante :

Un même échantillon d'urine (garçons de vingt ans) est divisé en deux fractions :

A) L'une est traitée selon la méthode appliquée dans ce travail.

Puis, nous avons effectué une solvolysé sur les urines préalablement extraites au trichloréthylène ; ceci dans le but de récupérer les stéroïdes non hydrolysés par le suc d'*Helix pomatia*.

Nous avons trouvé dans l'essai ainsi réalisé :

a). Après hydrolyse par le suc d'*Helix pomatia* :

— 17-céto-stéroïdes totaux : 7,5 mg/l.

Chromatographie :

	mg/litre	Pourcentage
DHA...	0,84	11,2
ANDRO...	2,55	34,1
ETIO...	2,30	30,7
11 COA...	0,18	2,4
11 COE...	0,66	8,7
11 OHA...	0,59	7,8
11 OHE...	0,38	5,1

TABLEAU I

b) Après solvolysé complémentaire :

— 17-céto-stéroïdes totaux : 1,9 mg/l.

Chromatographie : (voir tableau II)

B) La deuxième fraction est hydrolysée selon la méthode de LIEBERMAN, modifiée par BAULIEU, et nous faisons une chromatographie dans les mêmes conditions.

— 17-céto-stéroïdes totaux : 9,6 mg/l.

Chromatographie : (voir tableau III)

De la comparaison de ces tableaux, nous noterons la différence extrêmement faible entre $7,5 \text{ mg} + 1,9 \text{ mg} = 9,4 \text{ mg}$ et $9,6 \text{ mg}$, soit sensiblement une perte de 2 % qui peut être attribuée au traitement par le sel de baryum.

Les stéroïdes libérés par la solvolysé complémentaire sont, pour la quasi-totalité, de l'androstérone (sulfate d' α -stéroïde). Le reste des stéroïdes n'existe qu'à l'état de traces.

Dans ce cas étudié, la quantité de sulfate d'androstérone est particulièrement élevée, car il s'agit de sujets masculins et jeunes.

APPLICATION A L'ETUDE DES DIFFERENTS 17-CETO-STEROIDES SULFO ET GLYCURO-CONJUGUES

L'emploi systématique de la solvolysé par l'éther acétique et de la glycuronolysé par le suc digestif d'*Helix pomatia* permet l'étude de la conjugaison des 17-céto-stéroïdes urinaires. Nous en rapporterons un exemple appliqué à une urine de jeunes hommes.

a) Après solvolysé :

— 17-céto-stéroïdes sulfoconjugués : 2,8 mg/l.

TABLEAU II

	mg/litre	Pourcentage
DHA...	0,025	1,3
ANDRO...	1,497	78,8
ETIO...	0,135	6,6
11 COA...	0,044	2,3
11 COE...	0,209	11
11 OHA...	traces	
11 OHE...	traces	

	mg/litre	Pourcentage
DHA...	1,32	13,8
ANDRO...	3,95	41,2
ETIO...	2,35	24,5
11 COA...	0,23	2,4
11 COE...	0,65	6,8
11 OHA...	0,64	6,7
11 OHE...	0,44	4,6

TABLEAU III

Chromatographie : (voir tableau IV)

Nous constatons que la DHA et l'androstérone représentent la majeure partie des 17-céto-stéroïdes sulfoconjugués. Le rapport sulfate d'étio./sulfate d'andro. est inférieur à 1, ce que BAULIEU et al. ont récemment démontré comme étant lié au caractère génétique (¹).

b) Après action du suc d'Helix pomatia :

— 17-céto-stéroïdes glycuconjugués : 6,3 mg/l.

Chromatographie : (voir tableau V)

Les glycuconjugués sont représentés par une quantité importante d'androstérone, d'étiocolanolone et tous les dérivés oxygénés de ces stéroïdes.

1. E.E. BAULIEU, P. ROBET, P. MAUVAIS-JARVIS, C.R. Ac. Sc., 1963, t. 256, p. 1016.

TABLEAU IV

	mg/litre	Pourcentage
DHA...	1,25	44,7
ANDRO...	1,17	41,7
ETIO...	0,38	13,6
11 COA...	traces	
11 COE...	traces	
11 OHA...	traces	
11 OHE...	traces	

	mg/litre	Pourcentage
DHA...	traces	
ANDRO...	2,79	44,3
ETIO...	1,91	30,2
11 COA...	0,19	3,1
11 COE... *	0,50	8
11 OHA...	0,58	9,2
11 OHE...	0,33	5,2

TABLEAU V

CHAPITRE II

CHROMATOGRAPHIE

PRINCIPE

Un volume d'extrait correspondant à environ 1.000 μg en solution benzénique, est fixé par passage sur la colonne calibrée 6 mm, chargée à 6 g d'alumine. L'élution continue est réalisée au moyen de l'appareil par mélange graduel de deux solutions benzéniques, renfermant respectivement 0,2 % et 1,4 % d'éthanol. Les fractions recueillies au moyen du collecteur sont ensuite colorées par la réaction de Zimmermann et les densités optiques obtenues reportées sur un graphique.

MATERIEL

Cf. chapitre « Elaboration de l'appareillage » (page 22).

REACTIFS

a) ALUMINE :

— *Woelm basique* : cette alumine est fournie anhydre par le fabricant. Il suffit d'ajouter la quantité d'eau correspondant au pourcentage d'hydratation que l'on désire obtenir. Elle est utilisée à 6,50 % d'eau (p + p). L'eau peut être versée dans l'alumine assez rapidement en une fois. Le mélange est réalisé par agitation manuelle ou à l'aide d'un agitateur mécanique, le flacon étant obturé hermétiquement dès que l'eau est ajoutée. Un mûrissement de quelques jours avec agitation de temps à autre est nécessaire.

— *Mesure de l'hydratation* : la vérification éventuelle de l'hydratation ou au départ du caractère anhydre peut être pratiquée. Elle s'effectue par mesure de la perte de poids après chauffage à 100° C

pendant seize heures. Les pesées doivent être réalisées très rapidement après refroidissement dans un dessiccateur contenant P_2O_5 , pendant trente minutes.

— *Conservation* : l'alumine hydratée est stockée dans des flacons pour perfusion à bouchage de caoutchouc. Le bouchon est muni d'un tube de verre prolongé d'un tuyau de caoutchouc fermé par une pince à vis. Cette précaution permet de verser l'alumine directement sur la balance de façon précise et sans que la totalité soit en contact avec l'atmosphère extérieure. A chaque utilisation, il convient, en effet, d'éviter les échanges hygroscopiques entre alumine et air ambiant. L'alumine anhydre est particulièrement avide d'eau.

b) SOLUTIONS ÉLUANTES :

— *Benzène pur pour chromatographie* (benzène RP). Le benzène utilisé doit être redistillé ; il doit être obligatoirement exempt de toute trace d'eau ou de produits polaires. Cette redistillation s'impose afin d'éliminer l'eau éventuelle. Elle est effectuée en présence de sodium après contact de quelques jours avec ce dernier. Les fractions de tête et de queue sont éliminées. La vérification de l'absence de produits polaires est effectuée par essai chromatographique à l'aide de stéroïdes purs.

— *Ethanol absolu RP* : dans les cas où les blancs obtenus avec le résidu de la distillation de 1 ml d'éthanol donnent une coloration sensible avec les réactifs de Zimmermann, il y a lieu de changer le stock.

D'une façon générale, l'éthanol absolu RP nous a donné satisfaction.

— *Les solutions éluantes*, sont préparées à partir des deux produits précédents dans des fioles jaugées en ajoutant le benzène sur le volume adéquat d'éthanol.

Dans la méthode définitive, on utilise une solution à 0,2 % d'éthanol et une à 1,4 %.

Leur conservation est excellente dans des flacons à bouchage hermétique.

PRÉPARATION DE LA COLONNE

La verrerie utilisée doit être exempte de toute trace de substance polaire.

Remplir la colonne de benzène. Chasser l'air de la tubulure de sortie et du robinet en ouvrant quelques secondes ce dernier.

Descendre, au moyen d'une tige de verre, une petite bourre de coton hydrophile jusqu'à l'étranglement inférieur. Un disque de papier-filtre, de diamètre rigoureusement égal à celui de la colonne (6 mm), est ensuite placé de la même manière afin d'obtenir une surface plane. Ces disques sont découpés à l'emporte-pièce dans du papier-filtre de type « rapide ».

Peser rapidement au trébuchet 6 g d'alumine hydratée à 6,50 %. Verser doucement et régulièrement dans le benzène, ce dernier remplissant toute la colonne, y compris le rodage conique. Frapper quelques légers coups contre la colonne pour favoriser le tassement. Pendant ces opérations, le robinet est ouvert entièrement, afin de créer un courant liquide facilitant le tassement.

Remplir à nouveau de benzène les parties hautes de la colonne. Quand le niveau supérieur de l'alumine ne baisse plus, la colonne est prête. Correctement préparée, elle doit être exempte de bulles d'air. Placer en surface un disque de papier identique au précédent.

Verser 0,50 g de sable de grès lavé, ceci afin de maintenir en place la surface de l'alumine.

Laisser s'écouler le benzène jusqu'à une hauteur de 0,5 cm au-dessus du sable, en surveillant que son niveau ne descende pas en dessous. Fermer le robinet de la colonne.

FIXATION DES STEROIDES SUR LA COLONNE : ADSORPTION

Ajuster la colonne à son ampoule-réservoir (1).

Pendant le temps de tassement, on aura préparé la solution de fixation. Mesurer le volume d'extrait correspondant à la quantité de stéroïdes totaux qu'on désire fractionner. Cet extrait est stocké en solution éthanolique ; c'est pourquoi il est évaporé à sec dans un ballon sous vide à température de 40° C. Effectuer alors deux évaporations successives à sec de l'extrait remis en solution benzénique (5 ml à chaque fois), afin d'éliminer toute trace d'éthanol.

Reprendre le résidu sec ainsi obtenu par 4 ml de benzène. Verser la solution dans l'ampoule-réservoir et ouvrir le robinet de la colonne. Rincer le ballon à deux reprises par 3 ml de benzène (10 ml en tout).

1. Ampoule-réservoir cylindrique d'environ 100 ml, présentant à sa partie inférieure un rodage n° 1, et s'ouvrant à sa partie supérieure par un rodage n° 3 sur lequel s'ajuste un bouchon à tubulure permettant d'adapter une pression d'air.

Adapter la pression d'air afin d'accélérer le passage (même pression que celle utilisée au cours de l'élution : 50-100 g).

Quand le niveau atteint 0,5 cm au-dessus du sable, fermer le robinet.

ELUTION

Séparer la colonne du réservoir et l'adapter à l'appareil et au collecteur. Il importe de vérifier, à ce moment, la parfaite horizontalité du fond des récipients.

Le robinet du tube semi-capillaire de liaison étant fermé, verser doucement la solution à 0,2 % d'éthanol dans le flacon mélangeur, jusqu'à affleurement de la tubulure de sortie. Cette opération a pour but de remplir cette dernière, ainsi que la portion supérieure de la colonne et la partie basse du flacon (en tout 25 ml). Verser alors 80 ml de cette solution dans ce même récipient.

Ouvrir alors le robinet intermédiaire aux deux flacons et le refermer aussitôt, ceci afin de chasser l'air du tube semi-capillaire.

Verser alors la solution à 1,4 % d'éthanol dans le flacon donneur (105 ml). Les niveaux des deux solutions doivent être à même hauteur.

Mettre en fonctionnement l'agitateur magnétique.

Ouvrir le robinet du tube semi-capillaire, ainsi que celui de la colonne.

Le collecteur est alors branché, les fractions réglées à 2,5 ml (2,12 g).

La pression d'air est établie et ajustée en fonction de la vitesse de passage, au moyen du robinet du détendeur (environ 7 tubes à l'heure : 17,5 ml).

Les fractions recueillies dans les tubes du collecteur sont transvasées dans autant de tubes numérotés (éventuellement, on peut rincer au benzène chaque tube du collecteur et joindre cette portion).

EVAPORATION

Elle a lieu dans un évaporateur, à chaud, sous circulation d'air, à température inférieure à 80° C.

Nous avons constaté qu'à cette température, l'ensemble des 17-céto-stéroïdes dosés est stable.

CHAPITRE III

DOSAGE

I. — LA COLORATION

Elle est effectuée dans les tubes précédents, après évaporation à sec.

La technique adoptée est celle de HENRY et THÉVENET [12], utilisant la réaction de Zimmermann, dont la stabilité de la coloration et la bonne reproductibilité permettent une excellente détermination quantitative.

II. — LA MESURE PHOTOMÉTRIQUE

D'une manière générale, la détermination des densités optiques après coloration de Zimmermann se fait à trois longueurs d'onde, afin d'effectuer la correction d'Allen, éliminant l'interférence éventuelle de substances parasites.

En ce qui concerne le cas présent, la lecture peut n'être faite le plus souvent qu'à une seule longueur d'onde : 520 m μ .

Le faible intérêt, ici, de la correction d'Allen s'explique de deux façons :

A) PURETÉ DES CLOCHERS (1)

Un exemple de chromatogramme normal montre le résultat très voisin, que la lecture soit faite avec ou sans correction d'Allen :

Par conséquent, on observe un même rapport entre les différents clochers avec les deux modes de lecture.

1. Cf. « Etude de la pureté des clochers par chromatographie sur papier ».

TABLEAU VI

	Lecture 520 m μ (expression en équivalent de DHA)	Lecture avec correction d'Allen (470, 520, 570 m μ) (expression en équivalent de DHA)
17 CS totaux...	711 μ g	724 μ g
DHA...	11,2 %	11,2 %
ANDRO...	29,6 %	29 %
ETIO...	35,1 %	33,7 %
11 COA...	2,1 %	1,9 %
11 COE...	12 %	12,9 %
11 OHA...	4,8 %	5,5 %
11 OHE...	5,2 %	5,8 %

B) INSUFFISANCE DE LA CORRECTION D'ALLEN

En effet, dans certains cas où la correction d'Allen serait utile, elle ne suffit pas à éliminer des interférences. Notamment, dans quelques cas particuliers, où des substances telles que des indirubines peuvent se trouver mêlées à la DHA. Ces indirubines présentent une courbe d'absorption voisine de celle des 17-céto-stéroïdes ; la correction d'Allen est alors inefficace pour éliminer cette cause d'erreur par excès.

Ainsi, chez le sujet impubère que nous avons étudié, le taux de DHA est apparemment très sensiblement plus fort qu'il n'est en réalité. Seule la chromatographie sur papier permet d'apprécier la valeur réelle de la DHA qui atteint le plus souvent seulement le quart de la valeur apparente (¹).

1. Voir : « Etude de la pureté des clochers par chromatographie sur papier », ainsi que : « Expression des résultats ».

CHAPITRE IV

EXPRESSION DES RESULTATS

I. — CALCUL ET MODE D'EXPRESSION DES RÉSULTATS

On peut envisager trois possibilités dans l'expression des résultats :

- a) RÉSULTATS EXPRIMÉS EN ÉQUIVALENT DE DHA, A PARTIR DES DENSITÉS OPTIQUES MESURÉES A 520 $m\mu$:

Ce mode de lecture, par référence à la DHA seule, est couramment employé.

La détermination quantitative de chaque clocher est réalisée en faisant la somme des densités optiques qui leur correspondent. En cas de point limite intermédiaire non égal à zéro, on compte la moitié de la densité optique observée pour ce point dans la somme de chacun des pics adjacents.

Le résultat pondéral est obtenu en divisant ces mêmes sommes des densités optiques de chaque clocher par le coefficient ou pente d'étalonnage de la DHA.

Le pourcentage de chaque stéroïde est obtenu en divisant la somme des densités optiques de chaque clocher correspondant par la somme de toutes les densités optiques du chromatogramme.

- b) RÉSULTATS PAR LECTURE A TROIS LONGUEURS D'ONDE. CORRECTION D'ALLEN :

Il a été vu précédemment que son intérêt est faible dans le cas présent :

- taux de 17-céto-stéroïdes totaux peu différent par les deux méthodes ;
- même rapport entre les divers clochers.

Le principe de l'expression quantitative est le même, mais le calcul est fait à partir des densités optiques corrigées.

c) EXPRESSION EN FONCTION DE CHAQUE STÉROÏDE DE RÉFÉRENCE. EXPRESSION PONDÉRALE VRAIE :

Il en existe deux modes de calculs :

1° Le pouvoir chromogène, déterminé par la réaction de Zimmermann, a été étudié pour différents stéroïdes.

Des gammes d'étalonnage réalisées à partir de stéroïdes purs pesés fournissent des droites de pentes fort inégales. A partir de ces valeurs, des coefficients de correction peuvent être établis : la DHA étant prise arbitrairement égale à 1, les pouvoirs chromogènes trouvés pour les autres stéroïdes sont les suivants :

— Androstérone	0,95
— Etiocholanolone	1,2
— 11-cétoandrostérone	2,04
— 11-cétoétiocholanolone	2,08
— 11-hydroxyandrostérone	0,52
— 11-hydroxyétiocholanolone	0,73

En divisant la valeur trouvée à partir d'un étalonnage de DHA par le coefficient du pouvoir chromogène du stéroïde envisagé, on obtient sa vraie valeur pondérale.

2° On peut aussi calculer directement en divisant les sommes des densités optiques de chaque clocher par la pente d'étalonnage du stéroïde lui-même.

En conclusion, l'intérêt de se rapporter à chaque stéroïde de référence est surtout marqué dans quelques cas particuliers. Ainsi, chez les sujets impubères, et chez les femmes après la ménopause, on note une importante fraction 11-céto-étiocholanolone dont le coefficient du pouvoir chromogène est double de celui de la DHA (1). L'application de cette correction modifie très sensiblement le chromatogramme.

* *

En résumé :

1) Habituellement, l'expression sera faite en équivalent de DHA.

1. Voir chapitre « Clinique ».

2) Dans les cas où le chromatogramme comporte des variations des stéroïdes très chromogènes, on peut exprimer :

a) en équivalent de DHA ;

b) par rapport à chaque stéroïde.

A partir de ces valeurs, les différents rapports existant entre les stéroïdes peuvent être facilement calculés.

II. — TRACÉ DU CHROMATOGRAMME

Un graphique peut être établi, mettant en évidence de façon schématique les résultats de la chromatographie, et donnant une bonne appréciation des valeurs relatives des différents stéroïdes.

Le graphique est tracé sur papier millimétrique. En ordonnée sont reportées les valeurs des densités optiques trouvées pour chaque fraction. En abscisse, le numéro de chaque fraction.

Les échelles suivantes donnent la meilleure clarté du graphique :

— densité optique 0,100 = 20 mm ;

— une fraction = 5 mm.

Le chromatogramme est ainsi tracé.

CHAPITRE V

ANALYSE DES RESULTATS OBTENUS

I. — ÉTUDE DU RENDEMENT

Des essais de récupération ont été pratiqués au stade de la chromatographie.

A) ESSAIS DE RECUPERATION DE LA DHA

405 μg de DHA sont mis directement sur la colonne avec rinçage soigneux du récipient les contenant. Une quantité égale de 405 μg de DHA (même solution étalon) est prélevée avec la même pipette que précédemment et conservée en vue du dosage témoin. La chromatographie est effectuée dans les conditions habituelles. Les fractions correspondant à la DHA sont recueillies.

Ces dernières sont évaporées en même temps que les 405 μg témoins, et leur dosage est effectué parallèlement par la réaction de Zimmermann. La somme des densités optiques obtenues pour chaque série est étudiée comparativement :

— stéroïde récupéré après chromatographie	2,101
— stéroïde témoin	2,190

ce qui constitue un rendement de 96 %.

B) ESSAI DE RECUPERATION D'UN MELANGE DE STEROIDES

Un mélange est effectué :

— 11-cétoétiocholanolone	176 μg
— 11-hydroxyandrostérone	582 μg
— Androstérone	422 μg
— Etiocholanolone	400 μg
— Déhydroépiandrostérone	405 μg
	1.985 μg

Ce mélange est amené à 10 ml. On en prend 5 ml (= 1.985 $\mu\text{g}/2$) qui seront chromatographiés. Parallèlement, on prépare cinq séries de tubes avec les mêmes quantités des stéroïdes correspondants.

Les sommes des densités optiques (Σ D.O.) obtenues en fin d'expérience traduisent le pourcentage de la récupération :

	Dosages Σ D.O.	Témoin Σ D.O.	RENDEMENT
Déhydroépiandrostérone	2,168	2,280	95 %
Androstérone	1,932	2,066	93,5 %
Etiocholanolone	2,620	2,923	89,6 %
11-cétoétiocholanolone	1,612	1,777	90,7 %
11-hydroxyandrostérone	2,428	2,535	95,7 %

II. — REPRODUCTIBILITÉ DE LA TECHNIQUE

De nombreuses chromatographies ont été répétées plusieurs fois dans les mêmes conditions. Les chromatogrammes obtenus et les valeurs observées ont toujours présenté des écarts minimes.

Une étude comparative de trois chromatographies, réalisées dans les mêmes conditions à partir d'un extrait de sujet normal (J.P.H.), a montré les résultats suivants :

A) EMPLACEMENT DES CLOCHERS

NUMÉROS DES TUBES			
	1 ^{re} chromato.	2 ^e chromato.	3 ^e chromato.
DHA	14, 15, 16, 17	14, 15, 16, 17	14, 15, 16, 17
Andro	18, 19, 20, 21, 22	18, 19, 20, 21, 22	18, 19, 20, 21, 22
Etio	24, 25, 26, 27, 28	24, 25, 26, 27, 28	24, 25, 26, 27, 28
11-COA ...	34, 35, 36, 37	34, 35, 36, 37	34, 35, 36, 37
11-COE ...	40, 41, 42, 43	40, 41, 42, 43	40, 41, 42, 43
11-OHA ...	45, 46, 47, 48	45, 46, 47, 48	45, 46, 47, 48
11-OHE ...	55, 56, 57, 58	55, 56, 57, 58	55, 56, 57, 58

(Les numéros en italique correspondent aux points du graphique constituant les sommets des clochers ou très proches des sommets.)

B) SURFACE DES CLOCHERS

Les surfaces relatives des différents clochers entre eux correspondent à la somme des densités optiques des points les constituant. L'étude comparée de ces sommes de densités optiques pour chaque clocher sur trois chromatographies normales a montré :

Σ D.O.			
	1 ^{re} chromat.	2 ^e chromat.	3 ^e chromat.
DHA	0,228	0,238	0,262
Andro	0,933	1,046	0,938
Etio	1,603	1,845	1,778
11-COA ...	0,141	0,139	0,168
11-COE ...	0,830	0,757	0,745
11-OHA ...	0,340	0,383	0,363
11-OHE ...	0,295	0,315	0,287

Les écarts maxima observés :

DHA	13 %	(Ces écarts représentent des maxima d'erreur car ils ont été pris au hasard parmi un grand nombre de chromatographies, et sans tenir compte de certains facteurs, notamment stocks différents de solvants, température de la chromatographie, conditions de la réaction de Zimmermann.)
Andro	11 %	
Etio	12 %	
11-COA ...	12 %	
11-COE ...	9 %	
11-OHA ...	12 %	
11-OHE ...	10 %	

La bonne reproductibilité des résultats est sous la dépendance directe des conditions de la chromatographie qui doivent rester strictement identiques. C'est pourquoi, il est préférable de préparer un stock de réactifs ; en particulier alumine et solutions d'éluant. Quand on arrive à un changement du stock, il est bon de vérifier les nouveaux réactifs en comparant les résultats qu'ils procurent à partir d'un même extrait urinaire avec ceux donnés par le stock précédent.

D'autre part, toutes les conditions opératoires que nous avons envisagées au chapitre « Technique » doivent être rigoureusement respectées ; en effet, un léger écart dans les volumes d'éluant utilisé par rapport à une expérience précédente amène un déplacement des clochers.

III. — ÉTUDE DE LA PURETÉ DES CLOCHERS

Le processus expérimental mis en œuvre a été le suivant :

Les fractions recueillies après chromatographie sont séparées chacune en deux portions aliquotes égales. Sur l'une de ces deux séries obtenues, une réaction de Zimmermann est faite afin de vérifier l'emplacement des clochers. Sur l'autre série, les contenus des tubes correspondant à chaque clocher sont rassemblés. Des chromatographies sur papier sont alors effectuées à partir des solutions obtenues.

La chromatographie des trois premiers clochers est réalisée avec le système de solvants ligroïne/propylène-glycol sur papier Whatman n° 1, avec migration pendant quinze heures à 24° C. On fait migrer sur la même feuille, des témoins DHA, androstérone, étiocholanolone. En ce qui concerne les quatre derniers pics, le système utilisé est l'hexane/benzène, avec migration de quinze heures à 24° C. Les témoins, stéroïdes oxygénés en 11, sont placés de même. La révélation est faite par la réaction de Zimmermann.

Les résultats suivants ont été observés :

A) CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DU PREMIER CLOCHER

Réalisée simultanément à partir de ce clocher sur 4 cas différents (voir *fig. 4*) :

- Ga : traitement prolongé à l'A.C.T.H. ;
- Re : sujet impubère masculin ;
- Vor : chorioépithéliome testiculaire ;
- J.P. : homme normal (vingt ans).

Une même quantité de 50 μ g déterminés par la réaction de Zimmermann est déposée sur la ligne de départ. Un témoin (30 μ g DHA + 30 μ g épiandrostérone) est joint sur la même feuille.

Les résultats obtenus sont les suivants :

- Ga : tache de DHA évaluée à + ;
tache de départ très pigmentée, brune. La partie voisine de la ligne de départ présente une zone pigmentée orange qui vire au violet.
- Re : tache de DHA évaluée à + 1/2 ;
une tache d'épiandrostérone évaluée à 1/2 est observée ;
tache de départ très pigmentée ; zone attenante présentant un pigment violet.

- Vor : tache de DHA évaluée à ++++ ;
et tache d'épiandrostérone de 1/2 ;
tache de départ très peu pigmentée ; pas de pigments par ailleurs.
- J.P. : tache de DHA ++++ ;
et tache d'épiandrostérone 1/2 ;
tache de départ très peu pigmentée ; pas de pigments ailleurs.
- Témoin : tache de DHA +++ ;
tache d'épiandrostérone +++.

• INTERPRÉTATION :

— Dans les deux premiers cas, la quantité théorique de 50 μ g déposée, pourtant déterminée par mesure en trois longueurs d'onde, est en fait majorée par des pigments principalement constitués d'indirubines. La chromatographie sur papier permet seule ici de séparer et apprécier la proportion des deux, par comparaison avec les cas dépourvus de ces pigments. Ces derniers restent au voisinage de la ligne de départ. En définitive, sur les 50 μ g théoriques, 10 à 15 seulement correspondent à la DHA.

— Dans les deux cas suivants, le premier clocher est constitué uniquement de DHA et épiandrostérone. L'absence de pigments permet donc une mesure exacte par la réaction de Zimmermann en tubes. Le seul inconvénient est que DHA et épiandrostérone ne sont absolument pas séparés sur alumine. L'évaluation relative du rapport DHA/épiandrostérone est seule possible en complétant la séparation par chromatographie sur papier.

B) CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES DIFFERENTS CLOCHERS
(voir *fig. 5 et 6*)

Une quantité assez voisine pour chaque clocher est déposée en tenant cependant compte de l'inégalité des pouvoirs chromogènes. Des témoins stéroïdes purs encadrent les lignes de migration des substances précédentes.

Le résultat observé, est une tache unique pour chaque stéroïde, correspondant bien au témoin et migrant à la même vitesse pour chaque clocher.

Par ailleurs, apparition de quelques taches présentant une coloration bleue dans les conditions de la réaction de Zimmermann, mais dont l'intensité décroît lentement en plusieurs jours alors que les stéroïdes persistent.

Quatrième partie

CLINIQUE

Afin de montrer l'intérêt de cette méthode, nous avons réalisé les chromatogrammes de quelques cas normaux et pathologiques.

I. — CAS NORMAUX

1. — HOMME NORMAL

J.P. : vingt ans

- CHROMATOGRAMME (voir *fig. 7*, et *tableau VII*)

RAPPORTS

	<i>Equivalent de DHA</i>	<i>Equivalent de stéroïde</i>
A		
E	0,84	1,05
11-COA		
11-COE	0,1	0,1
11-OHA		
11-OHE	1	0,7
A + 11-COA + 11-OHA	0,7	1,04
E + 11-COE + 11-OHE		
Stéroïdes non oxygénés en 11	3,11	2,96
Stéroïdes oxygénés en 11		

INTERPRETATION

- 1) Caractères du chromatogramme normal :
Il présente 7 clochers :
— le premier correspond à DHA + épiandrosterone ;

	mg. par 24 heures				Pourcentage			
	sans corr. d'ALLEN		avec corr. d'ALLEN		sans corr. d'ALLEN		avec corr. d'ALLEN	
	Equivalent DHA	Equivalent stéroïdes référence	Equivalent DHA	Equivalent stéroïdes référence	Equivalent DHA	Equivalent stéroïdes référence	Equivalent DHA	Equivalent stéroïdes référence
DHA...	1,16	1,09	1,19	1,12	11,2	11,8	11,2	11,8
ANDRO...	3,07	3,05	3,07	3,03	29,6	33	29	32,1
ETIO...	3,65	2,86	3,57	2,78	35,1	30,9	33,7	29,4
11 COA..	0,22	0,09	0,20	0,09	2,1	1	1,9	1
11 COE..	1,24	0,56	1,36	0,61	12	6,1	12,9	6,5
11 OHA..	0,50	0,89	0,58	1,04	4,8	9,7	5,5	11
11 OHE..	0,54	0,62	0,61	0,77	5,2	7,5	5,8	8,2
17 CS totaux	10,39	9,24	10,6	9,47				

(1) Nous avons adopté les abréviations suivantes :

DHA = déhydroépiandrostérone

A = androstérone

E = étiolanolone

11-COA = 11-cétoandrostérone

11-COE = 11-cétoétiolanolone

11-OHA = 11-hydroxyandrostérone

11-OHE = 11-hydroxyétiolanolone

— les autres sont constitués chacun d'un stéroïde ; dans l'ordre, on observe :

- androstérone, étiocholanolone ;
- et enfin, 4 stéroïdes oxygénés en 11 : 11-céto-androstérone, 11-céto-étiocholanolone, 11-hydroxy-androstérone, 11-hydroxy-étiocholanolone.

La séparation de 11-céto-étiocholanolone et 11-hydroxy-androstérone est en général incomplète, mais suffisante pour une bonne appréciation quantitative.

Une séparation totale serait obtenue en opérant à 13° C (cf. colonne à manchon).

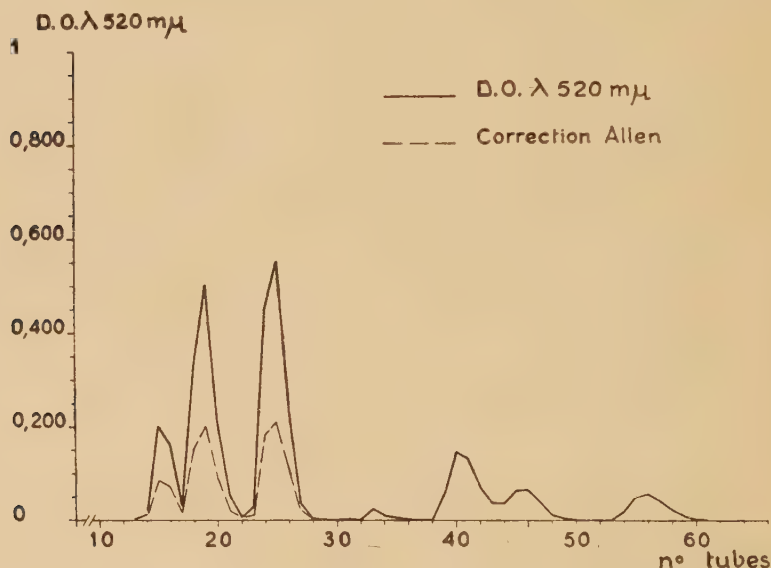


FIG. 7 — Chromatogramme : homme normal (lecture photométrique par rapport à une gamme de DHA). 7 clochers (de gauche à droite) : DHA + épian-drostérone, androstérone, étiocholanolone, 11-céto-androstérone, 11-céto-étiocholanolone, 11-hydroxy-androstérone, 11-hydroxy-étiocholanolone

2) En ce qui concerne l'expression des résultats : peu de différence entre expression en équivalent de DHA et expression par rapport au stéroïde de référence.

3) L'étude des rapports entre les différents stéroïdes met en évidence les points suivants :

- le rapport androstérone/étiocholanolone est voisin de 1 ;

- il existe une nette prédominance de 11-céto-étiocholanolone sur 11-céto-androstérone ;
- le rapport entre les 11-hydroxy-stéroïdes est par contre voisin de 1 ;
- le rapport entre les sommes de stéroïdes de la série androstérone et de la série étiocholanolone est un peu inférieur à 1 ;
- le rapport entre stéroïdes non oxygénés en 11 et stéroïdes oxygénés en 11 est voisin de 3.

2. — SUJET IMPUBÈRE DE SEXE MASCULIN

Re : douze ans

- CHROMATOGRAMME (voir *fig. 8*) :

TABLEAU VIII

	mg. par 24 heures —		Pourcentage	
	Equivalent DHA	Equivalent stéroïdes référence	Equivalent DHA	Equivalent stéroïdes référence
DHA...	0,13	0,13	8,4	10,3
ANDRO...	0,070	0,073	4,9	6,5
ETIO...	0,13	0,11	8,5	8,6
11 COA...	0,06	0,03	4,3	2,5
11 COE...	0,81	0,38	51,9	30,5
11 OHA...	0,11	0,21	7,2	16,9
11 OHE...	0,23	0,31	14,8	24,7
17 CS totaux	1,57	1,24		

RAPPORTS

	<i>Equivalent de DHA</i>	<i>Equivalent de stéroïde</i>
A	0,57	0,74
E		
11-COA	0,08	0,08
11-COE		
11-OHA	0,48	0,68
11-OHE		
A + 11-COA + 11-OHA ..	0,21	0,40
E + 11-COE + 11-OHE ..		
Stéroïdes non oxygénés en 11 ..	0,38	0,33
Stéroïdes oxygénés en 11 ..		

INTERPRETATION

En ce qui concerne l'expression des résultats, les valeurs données en équivalent de DHA sont notablement différentes de celles se référant au stéroïde lui-même. En effet, le taux important de stéroïdes à pouvoir chromogène élevé modifie les rapports entre les différents clochers.

La valeur trouvée pour la DHA est, en fait, majorée dans de larges proportions par la présence de pigments passant avec la DHA (cf. Chromatographie sur papier). Les pigments sont, en général, assez abondants sur les colonnes chargées d'extraits de sujets impubères. La valeur réelle de la DHA n'est que le tiers ou le quart de la valeur trouvée par la réaction de Zimmermann, et n'existe le plus souvent qu'à l'état de traces.

On note une petite quantité d'androstérone et d'étiocolanolone ; le rapport est en faveur de l'étiocolanolone.

La quantité de 11-céto-étiocolanolone est énorme par rapport au reste. Ce qui montre que c'est un des seuls métabolites importants de la surrénale.

La 11-hydroxy-étiocolanolone est double de la 11-hydroxy-androstérone.

Le rapport des sommes des dérivés andro. et étio. montre la nette prédominance de la série étio.

Le rapport entre stéroïdes non oxygénés en 11 et stéroïdes oxygénés en 11 d'origine surrénalienne est très bas.

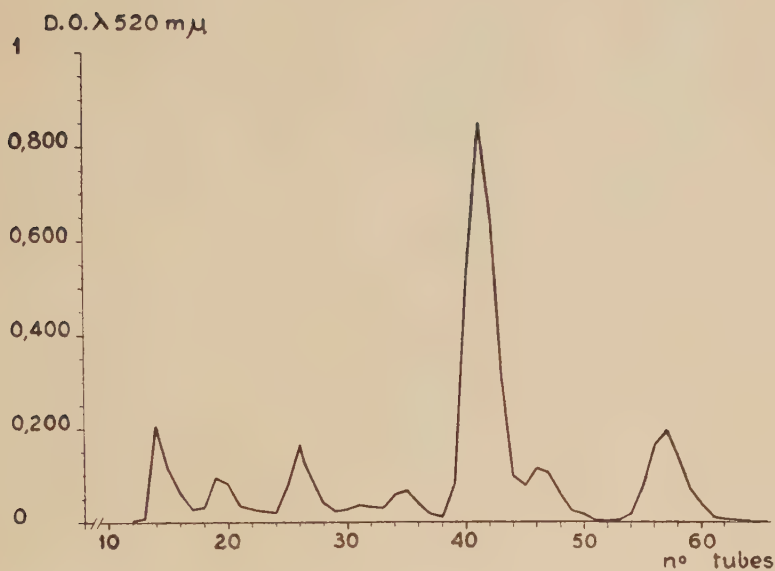


FIG. 8 — Chromatogramme : sujet impubère de sexe masculin

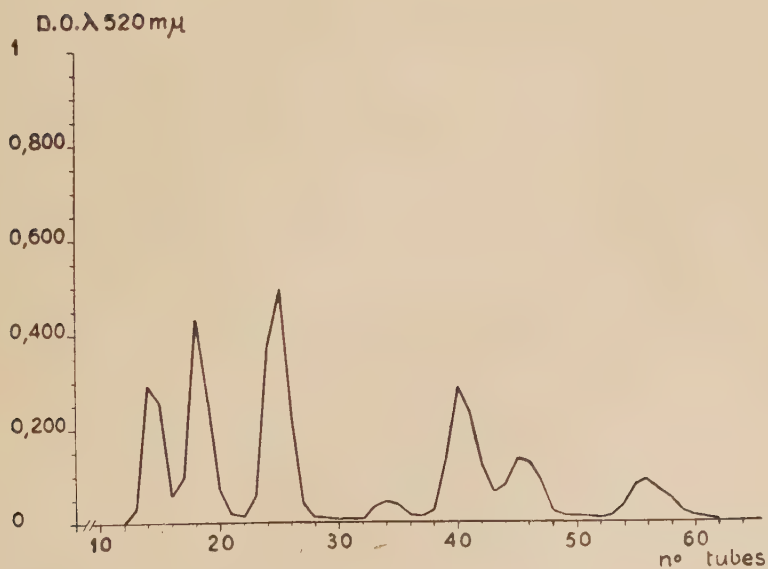


FIG. 9 — Chromatogramme : femme ménopausée

3. — FEMME MÉNOPAUSÉE

D..., cinquante-six ans

- CHROMATOGRAMME (voir *fig. 9*) :

TABLEAU IX

	mg. par 24 heures		Pourcentage	
	Equivalent DHA	Equivalent stéroïdes référence	Equivalent DHA	Equivalent stéroïdes référence
DHA...	0,56	0,56	12,1	12,1
ANDRO...	0,93	0,98	19,9	27,4
ETIO...	1,26	1,05	27	22,8
11 COA...	0,14	0,06	3	1,3
11 COE...	0,85	0,41	18,4	8,9
11 OHA...	0,53	1,02	11,4	28,2
11 OHE...	0,38	0,52	8,2	11,3
17 CS totaux	4,70	4,60		

RAPPORTS

	<i>Equivalent de DHA</i>	<i>Equivalent de stéroïde</i>
A		
E	0,74	0,93
11-COA		
11-COE	0,17	0,15
11-OHA		
11-OHE	1,39	1,96
A + 11-COA + 11-OHA		
E + 11-COE + 11-OHE ..	0,64	1,04
Stéroïdes non oxygénés en 11		
Stéroïdes oxygénés en 11 ..	1,44	1,29

INTERPRETATION

— Valeurs assez différentes en exprimant par rapport aux stéroïdes de référence.

— Fractions importantes de stéroïdes d'origine surrénalienne.

— Aspect du chromatogramme se rapprochant de celui du sujet impubère.

— Les stéroïdes de la série andro. sont en minorité par rapport à ceux de la série étio., métabolite du type surrénal. Il existe ici une majoration du taux d'hormone gonadotrope du type hypophysaire avec diminution de la réponse gonadique.

II. — INFLUENCE DE LA SURRENALE

Ga : vingt ans. Traitement à l'A.C.T.H. prolongé (60 U.I. par vingt-quatre heures) pour maladie de Wissler-Fanconi.

- CHROMATOGRAMME (voir *fig. 10*) :

TABLEAU X

	mg. par 24 heures		Pourcentage	
	Equivalent DHA	Equivalent stéroïdes référence	Equivalent DHA	Equivalent stéroïdes référence
DHA...	0,59	0,59	8,4	9,8
ANDRO...	0,34	0,35	4,8	5,8
ETIO...	1,66	1,36	23,4	22,6
11 COA...	0,14	0,07	2	1,1
11 COE...	2,70	1,29	38	21,1
11 OHA...	0,27	0,50	3,9	8,6
11 OHE...	1,39	1,90	19,5	31
17 CS totaux	7,13	6,06		

RAPPORTS

	<i>Equivalent de DHA</i>	<i>Equivalent de stéroïde</i>
A		
E	0,204	0,25
11-COA		
11-COE	0,05	0,05
11-OHA		
11-OHE	0,19	0,27
A + 11-COA + 11-OHA		
E + 11-COE + 11-OHE	0,13	0,207
Stéroïdes non oxygénés en 11		
Stéroïdes oxygénés en 11	0,57	0,61

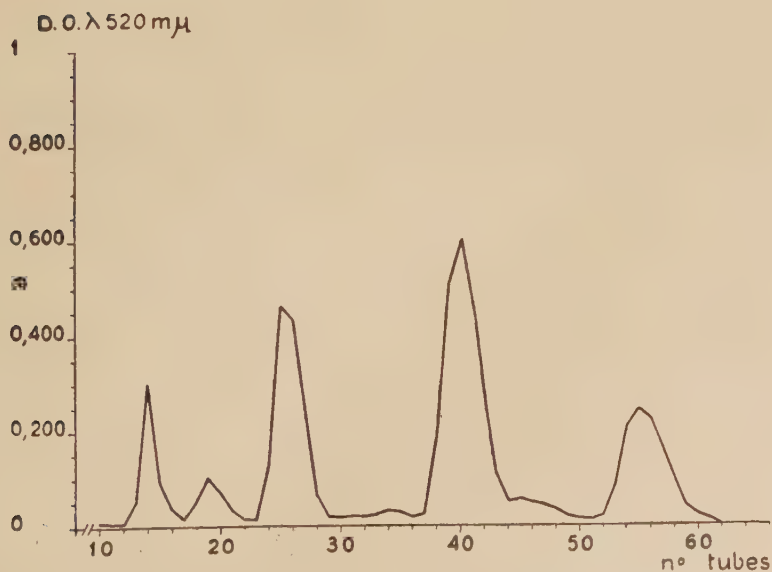


FIG. 10 — Chromatogramme : maladie de Wissler-Fanconi
sous traitement prolongé à l'A.C.T.H.

INTERPRETATION

Chromatogramme dont l'aspect est voisin de celui du sujet non pubère. Présence de nombreux pigments interférents entraînant une majoration du taux de DHA (cf. Chromatographie sur papier).

La détermination réelle de la DHA est seule possible par chromatographie sur papier à partir du premier clocher.

Prédominance de la série étio. par rapport au groupe andro. Probablement, cette majorité ne tient qu'à la présence de la quantité d'A.C.T.H. exogène extrêmement grande, et non à la maladie elle-même.

III. — INFLUENCE DES HORMONES GONADOTROPES

1. — HORMONE CHORIONIQUE

Vor : *chorio-épithéliome du testicule*. Présente un taux de 1.400.000 U.I. de Gonadotropine chorionique.

- CHROMATOGRAMME (voir *fig. 11*) :

TABLEAU XI

	mg. par 24 heures		Pourcentage	
	Equivalent DHA	Equivalent stéroïdes référence	Equivalent DHA	Equivalent stéroïdes référence
DHA...	2,20	2,20	22,3	22
ANDRO...	3,54	3,72	35,8	37
ETIO...	2,20	1,83	22,3	18,3
11 COA...	0,20	0,09	2,1	1
11 COE...	0,66	0,31	6,7	3,2
11 OHA...	0,72	1,38	7,3	13,8
11 OHE...	0,34	0,46	3,5	4,7
17 CS totaux	9,90	9,99		

RAPPORTS

	<i>Equivalent de DHA</i>	<i>Equivalent de stéroïde</i>
A	1,60	2,02
E		
11-COA	0,32	0,32
11-COE		
11-OHA	2,06	2,92
11-OHE		
A + 11-COA + 11-OHA ..	1,38	1,98
E + 11-COE + 11-OHE ..		
Stéroïdes non oxygénés en 11 ..	4,1	3,01
Stéroïdes oxygénés en 11 ..		

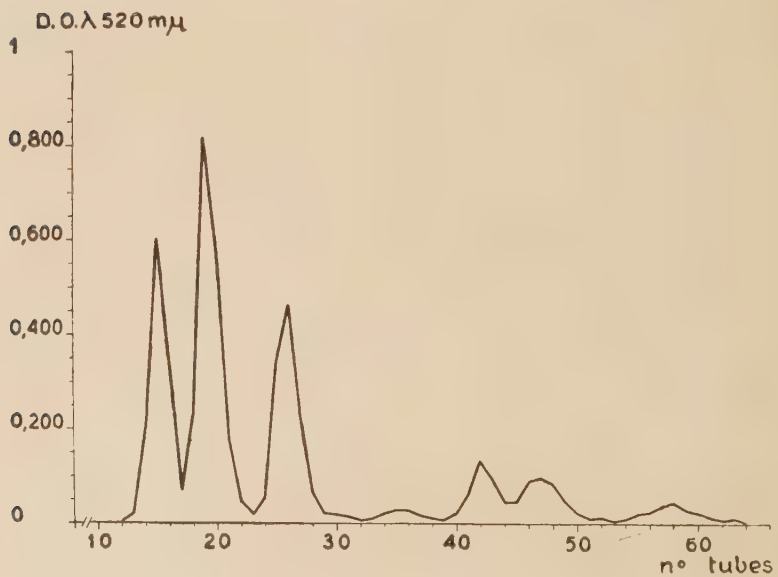


FIG. 11 — Chromatogramme : chorio-épithéliome du testicule

INTERPRETATION

On note une augmentation du rapport de l'androstérone sur l'étiolanolone.

De même, dans la série des stéroïdes oxygénés en 11, le groupe andro. est prédominant sur le groupe étio.

En ce cas pathologique, la présence anormalement élevée de gonadotropines chorioniques est probablement responsable de cette majoration de la série androstérone.

2. — HORMONE HYPOPHYSAIRE (H.M.G.)

D.: Sujet adulte ayant présenté, six mois après les oreillons, une prise de poids importante avec gynécomastie.

Le taux de FSH : 300 U.S. par vingt-quatre heures.

- CHROMATOGRAMME (voir *fig. 12*) :

TABLEAU XII

	mg. par 24 heures		Pourcentage	
	Equivalent DHA	Equivalent stéroïdes référence	Equivalent DHA	Equivalent stéroïdes référence
DHA...	9,02	9,02	39,6	41,8
ANDRO...	4,14	3,45	18,4	16,2
ETIO...	5,44	4,53	23,9	21,4
11 COA...	0,18	0,08	0,8	3,3
11 COE...	1,50	0,72	6,6	3,3
11 OHA...	0,73	1,40	3,2	6
11 OHE...	1,75	2,39	7,7	11
17 CS totaux	22,8	21,59		

RAPPORTS

	<i>Equivalent de DHA</i>	<i>Equivalent de stéroïde</i>
A		
E	0,76	0,62
11-COA		
11-COE	0,12	0,12
11-OHA		
11-OHE	0,41	0,41
A + 11-COA + 11-OHA		
E + 11-COE + 11-OHE ..	0,69	0,63
Stéroïdes non oxygénés en 11		
Stéroïdes oxygénés en 11 ..	4,47	5,21

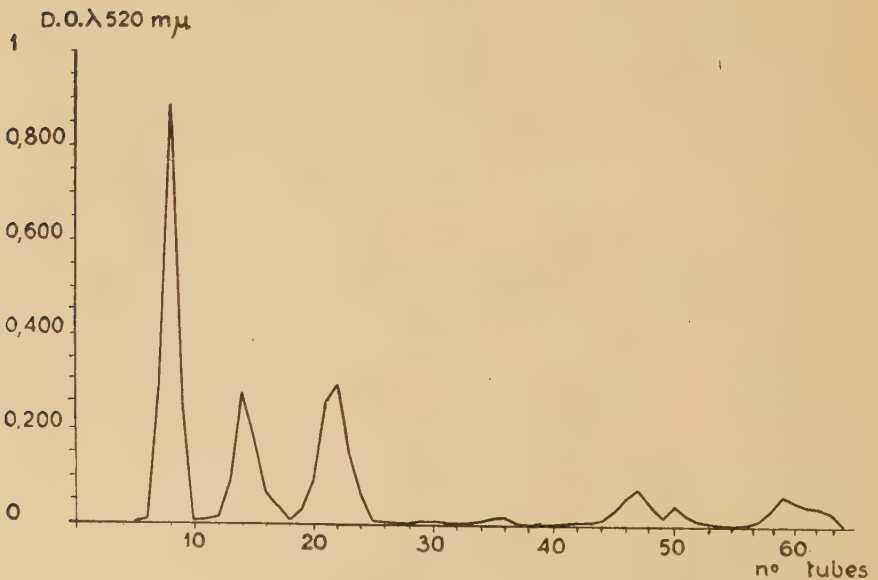


FIG. 12 — Chromatogramme : hypogonadisme d'origine ourlienne (la place des clochers, différente de celle des autres chromatogrammes, est fonction de conditions expérimentales particulières)

INTERPRETATION

Nous notons chez ce sujet un abaissement relatif de l'androstérone et de l'étiocolanolone, probablement témoin de l'atteinte testiculaire. Nous notons en même temps l'augmentation considérable du sulfate de DHA.

IV. — INFLUENCE DU CORPS THYROÏDE

Y... : hyperthyroïdie avant tout traitement.

- CHROMATOGRAMME (voir *fig. 13*) :

TABLEAU XIII

	mg. par 24 heures		Pourcentage	
	Equivalent DHA	Equivalent stéroïdes référence	Equivalent DHA	Equivalent stéroïdes référence
DHA...	0,72	0,72	6,75	6,82
ANDRO...	4,31	4,53	39,85	42,93
ETIO...	1,98	1,65	18,70	15,64
11 COA...	0,35	0,17	3,27	1,62
11 OHA...	1,16	2,23	11,70	8,29
11 OHE...	0,28	0,38	2,63	3,60
17 CS totaux	10,62	10,55		

RAPPORTS

	<i>Equivalent de DHA</i>	<i>* Equivalent de stéroïde</i>
A		
E	2,17	2,74
11-COA		
11-COE	0,19	0,19
11-OHA		
11-OHE	4,16	5,86
A + 11-COA + 11-OHA		
E + 11-COE + 11-OHE ..	1,42	2,36
Stéroïdes non oxygénés en 11		
Stéroïdes oxygénés en 11 ..	1,94	1,88

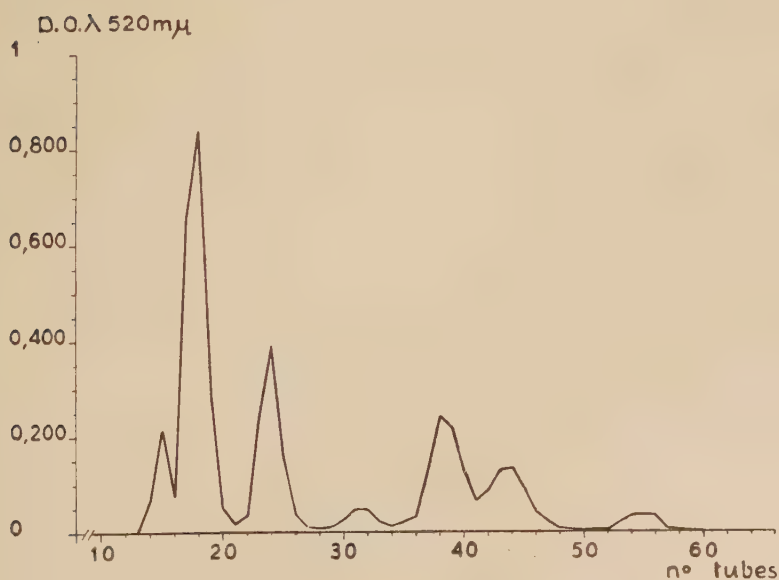


FIG. 13 — Chromatogramme : hyperthyroïdie

INTERPRETATION

On note une nette prédominance de l'androstérone sur l'étiolanolone.

De même, tous les stéroïdes de la série andro. sont en majorité par rapport à ceux de la série étio.

Il s'agit ici d'une confirmation des travaux de HELLMAN [10]. En effet, pour cet auteur, les affections thyroïdiennes à retentissement hormonal entraînent des modifications des rapports andro./étio. :

- l'hyperthyroïdie augmente le rapport, qui devient voisin de 2 ;
 - l'hypothyroïdie diminue le rapport, qui devient voisin de 1/7.
-

V. — ETUDE DES GLYCURO ET SULFOCONJUGUES

G... : hirsutisme essentiel avec hypoménorrhée.

— 17-CS totaux : 10,27 mg/24 h (résultat exprimé en DHA).

RAPPORTS DES GLYCURO ET SULFOCONJUGUES

— Glycuroconjugués : 70 %.

— Sulfoconjugués : 30 %.

TABLEAU XIV

	mg/24 h.	rapport	Valeurs normales (selon MAUVAIS et BAULIEU (22))	
Sulfate d'Androstérone + Sulfate d'Etiocholanolone	1,24		0,50	
<u>Sulfate A</u> Sulfate E		2,60		0,40
Glycuronate d'Androstérone + Glycuronate d'Etiocholanolone	4,91		3,10	
<u>Glycuronate A</u> Glycuronate E		0,85		0,55
Sulfate + Glycuronate d'Androstérone et d'Etiocholanolone	6,15		3,50	
<u>Sulfate A + Sulfate E</u> Glycuronate A + E		0,25		0,60

INTERPRETATION

Augmentation importante de la fraction sulfate d'androstérone.

CONCLUSIONS

Nous avons essayé de réaliser une séparation chromatographique des 17-céto-stéroïdes urinaires sur colonne d'alumine, à l'aide d'un gradient d'élution. Le type linéaire de la variation fut choisi en raison de sa facilité d'étude, du nombre limité de variables et de sa reproductibilité aisée.

— Ce travail comporta en premier lieu une étape d'élaboration de l'appareillage, permettant d'obtenir ce type de gradient dont nous avons pu vérifier expérimentalement la linéarité.

— Nous avons appliqué cette méthode à des recherches cliniques sur l'élimination des 17-céto-stéroïdes urinaires, tout en définissant les conditions d'hydrolyse, d'élution, de mesure photométrique et d'expression des résultats, propres à en simplifier l'utilisation en lui conservant toute sa précision.

— Nous avons étudié la reproductibilité des résultats : qualitative d'une part, dans la place des différents clochers ; quantitative d'autre part, dans la surface de chacun de ces clochers.

— Nous avons expérimenté l'application de cette méthode à des urines normales et dans quelques cas pathologiques. Nous avons précisé l'identité des fractions séparées et leurs variations en diverses éventualités.

Cette méthode permet ainsi une étude qualitative et quantitative des différents produits du métabolisme des 17-céto-stéroïdes (DHA, androstérone, étiocolanolone et leurs dérivés oxygénés en 11) et une détermination précise de leurs rapports. De plus, il est possible, par l'emploi d'une technique d'hydrolyse appropriée, d'étudier le rapport des fractions des 17-céto-stéroïdes éliminés sous forme de glycurol et sulfoconjugués.

Vu, le Doyen :
BINET

Vu, le Président de Thèse :
JAYLE

Vu et Permis d'imprimer,
le Recteur de l'Académie de Paris :
ROCHE

BIBLIOGRAPHIE

	Pages
1. BAUER (J.), KARL (J.). — Der chemische und Krystalline Nachweis von androgenen und corticoiden Wirkstoffen aus Urin und Geschwulstgewebe bei virilisierendem Ovarialtumor. (<i>Ztschr. Ges. Exper. Med.</i> , 1951-1952, 118, 425.)	16
2. BAULIEU (E.E.), MICHAUD (G.). — Méthode simple d'analyse chromatographique des 17-CS urinaires, destinée aux investigations cliniques. (<i>Ann. Biol. Clin.</i> , 3-4 avril-mai 1961.)	44
3. BROOKS (R.V.). — A method for the quantitative fractionation of urinary 17-oxo-steroids with some observations on steroid excretion during administration of A.C.T.H. and in the adrenogenital syndrome. (<i>Bioch. J.</i> , 1958, 68, 50.)	16
4. BROOKSBANK (B.W.L.), SALOKANGAS (A.). — Fractional analysis of urinary neutral 17-ketosteroids in relation to age. (<i>Acta Endoc.</i> , 1959, 30, 231.)	17
5. DEVIS (R.). — La technique du dosage fractionné des 17-céto-stéroïdes urinaires. (<i>Revue Belge Path. Méd. Exp.</i> , 1950-1951, 20, suppl. 5-151.)	16
6. DEVIS (R.). — Technique de fractionnement des 17-CS urinaires. (<i>Réunion Endocrinologues Langue Franç., Rapports</i> , Masson et Cie éd., 1951, p. 187.)	16
7. DINGEMANSE (E.), HUIS IN'T VELD (L.G.) and DE LAAT (B.M.). — Clinical method for the chromatographic-colorimetric determination of urinary 17-KS. (<i>J. Clin. Endoc.</i> , 1946, 6, 535.)	15
8. DINGEMANSE (E.), HUIS IN'T VELD (L.G.), HARTOGH-KATZ (S.L.). — Clinical method for the chromatographic colorimetric determination of urinary 17-KS. (<i>J. Clin. Endoc.</i> , 1952, 12, 66.)	16

Nota: 1° Les numéros de la colonne de gauche sont placés entre crochets dans le texte. 2° Les numéros de la colonne de droite renvoient aux pages du texte où se trouve mentionné le travail référé.

	Pages
9. DROSDOWSKY (M.), SCHOLLER (R.), JAYLE (M.F.). — Séparation chromatographique et dosage de trois fractions des 17-cétostéroïdes. (In M.F. Jayle : <i>Analyse des stéroïdes hormonaux</i> , Masson et Cie éd., 1962, t. II, p. 64.)	16
10. HELLMAN (L.), BRADLOW (H.L.), ZUMOFF (B.), FUKUSHIMA (D.K.), GALLAGHER (T.F.). — Thyroid-androgen interrelations and the hypocholesterolemic effect of androsterone. (<i>J. Clin. End. and Mb.</i> , 1959, 19, 936.)	86
11. HENRY (R.) et SORDA (R.). — Appareil à extraction rotatif. (<i>Bull. Soc. Chim. Biol.</i> , 1951, 33, 1612.)	42
12. HENRY (R.) et THÉVENET (M.). — Dosage des 17-CS urinaires. (<i>Fiches Techniques Fleury, Urine</i> , 36.)	54
13. HENRY (R.) et THÉVENET (M.). — Collecteur semi-automatique de fractions pour l'analyse microchromatographique des stéroïdes urinaires. (<i>Bull. Soc. Chim. Biol.</i> , 1952, 34, 839.)	26
14. HENRY (R.) et THÉVENET (M.). — Action du suc digestif d' <i>Helix pomatia</i> sur les différents stéroïdes conjugués urinaires. (<i>Bull. Soc. Chim. Biol.</i> , 1952, 34, 886.)	43
15. HENRY (R.) et THÉVENET (M.). — Technique rapide de chromatographie des 17-CS neutres. (<i>Ann. Endoc.</i> , 1953, 14, 512.)	24
16. JARRIGE (P.) et HENRY (R.). — Etude de l'activité glycuronidasique du suc digestif d' <i>Helix pomatia</i> et de sa phénol-sulfatase. (<i>Bull. Soc. Chim. Biol.</i> , 1952, 34, 872.)	43
17. JOHNSEN (S.G.). — Fractionation of urinary 17-ketosteroids. (<i>Acta Endoc.</i> , 1956, 21, 127.)	16
18. KELLIE (A.E.) and WADE (A.P.). — The analysis of urinary 17-oxosteroids by gradient elution. (<i>Biochem. J.</i> , 1957, 66, 196.)	17
19. LAKSHMANAN (T.K.) and LIEBERMAN (S.). — An improved method of gradient elution chromatography and its application to the separation of urinary ketosteroids. (<i>Arch. Bioch. Bioph.</i> , 1954, 53, 258.)	16
20. LEBRETON (P.). — L'analyse chromatographique avec gradient d'élu-tion. (<i>Bull. Soc. Chim. de France</i> , 1960, 11-12, 2188.)	17
21. MARTI (M.). — Die chromatographische Trennung und Bestimmung der 17-Ketosteroidé im Urin. (<i>Helv. Med. Acta</i> , 1951, 18, 215.)	16
22. MAUVAIS-JARVIS (P.) and BAULIEU (E.E.). — Urinary 17-ketosteroid conjugates in hirsutism. (<i>J. of Clin. Invest.</i> , 1962, 8, 1690.)	87
23. MIGEON (C.J.) and PLAGER (J.E.). — A method for the fractionation and measurement of 17-ketosteroids in human plasma. (<i>J. Clin. Endoc. Met.</i> , 1955, 15, 702.)	16

	Pages
24. PLANTIN (L.O.), BIRKE (G.). — Isolation and determination of the 17-ketosteroids in urine. (<i>Acta Medica Scand.</i> , 1954, suppl. 291-296, p. 5.)	16
25. POND (M.H.). — A microchromatographic method for the separation of certain fractions of 17-ketosteroids in human urine. (<i>Lancet</i> , 1951, 261, 906.)	16
26. ROBINSON (A.M.) and GOULDEN (F.). — A qualitative study of urinary 17-ketosteroids in normal males and in men with prostatic disease. (<i>Brit. Med. J. Cancer</i> , 1949, 3, 62.)	16
27. STAIB (W.), SCHILD (W.). — 17-Ketosteroidbestimmung im Harn: Erfahrungen über die Fraktionierung des neutralen Harnextraktes mittels Gradienten-Elutions-Chromatographie nach Lakshmanan und Lieberman. (<i>Klin. Wchschr.</i> , 1958, 36, 166.)	17
28. TISELIUS (A.W.K.). — Progrès récents en chromatographie. (<i>Endeavour</i> , 1952, 11, 5.)	16
29. VESTERGAARD (P.). — Technique for simultaneous multiple-column gradient elution chromatography. (<i>J. Chromatog.</i> , 1960, 3, 560.)	17
30. VESTERGAARD (P.). — Gradient elution chromatography of urinary 17-Ketosteroids. (<i>Acta Endoc.</i> , 1962, suppl. 64, 3.)	35
31. WILKINS (R.B.), CARLSON (L.D.). — Qualitative studies of neutral 17-Ketosteroids in normal subjects. (<i>J. Clin. Endoc. Met.</i> , 1952 12, 647.)	16
32. ZIMMERMANN (H.), STAIB (W.), PELZER (H.). — 17-Ketosteroidbestimmung im Harn: Ein Beitrag zur säulen chromatographischen Fraktionierung der Harn. 17-Ketosteroide nach Johnsen. (<i>Klin. Wchschr.</i> , 1958, 36, 982.)	16
33. ZYGMUNTOWICZ (A.S.), WOOD (M.), CHISTO (E.) and TALBOT (N.B.). — Studies of urinary 17-Ketosteroids excretion by means of a new micro-chromatographic fractionation procedure. (<i>J. of Clin. Endoc.</i> , 1951, 11, 578.)	16

TABLE DES MATIÈRES

Introduction	15
------------------------	----

Première partie

<i>Chapitre I</i> — Bases théoriques du gradient linéaire. Calcul mathématique . .	19
<i>Chapitre II</i> — Elaboration de l'appareillage	22
— Appareil permettant un gradient de concentration	22
— Colonnes	24
— Appareils annexes	26

Deuxième partie

LES ESSAIS EXPERIMENTAUX

<i>Chapitre I</i> — Etude expérimentale de la linéarité du gradient	30
<i>Chapitre II</i> — Etude expérimentale de la chromatographie	32
— Etude des aluminés	32
— Etude de l'influence de la température sur le fractionnement	34
— Etude de l'influence de la concentration des solvants d'élution sur la séparation des stéroïdes	36
— Rôle de la vitesse d'écoulement ou débit de la colonne	38
— Influence du volume des fractions sur la qualité du chromatogramme.	38
— Etude de la charge en stéroïdes de la colonne	39

Troisième partie

TECHNIQUE

<i>Chapitre I</i> — Préparation de l'extrait	42
<i>Chapitre II</i> — Chromatographie	50

<i>Chapitre III — Dosage</i>	<i>54</i>
— <i>La coloration</i>	<i>54</i>
— <i>La mesure photométrique</i>	<i>54</i>
<i>Chapitre IV — Expression des résultats</i>	<i>57</i>
— <i>Calcul et mode d'expression des résultats</i>	<i>57</i>
— <i>Tracé du chromatogramme</i>	<i>59</i>
<i>Chapitre V — Analyse des résultats obtenus</i>	<i>60</i>
— <i>Etude du rendement</i>	<i>60</i>
— <i>Reproductibilité de la technique</i>	<i>61</i>
— <i>Etude de la pureté des clochers</i>	<i>63</i>

Quatrième partie

CLINIQUE

I. — <i>Cas normaux</i>	<i>68</i>
II. — <i>Influence de la surrénale</i>	<i>76</i>
III. — <i>Influence des hormones gonadotropes</i>	<i>79</i>
IV. — <i>Influence du corps thyroïde</i>	<i>84</i>
V. — <i>Etude des glycuro et sulfoconjugués</i>	<i>87</i>
<i>Conclusions</i>	<i>89</i>
<i>Bibliographie</i>	<i>91</i>

